

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**Facultad de Ciencias**

**Departamento de Biología Molecular**

**Programa de Doctorado en Microbiología**

**Caracterización virológica,  
monitorización del VIH y análisis de  
marcadores inmunes en sangre seca de  
población pediátrica y adulta de Kinshasa,  
República Democrática del Congo.**

**TESIS DOCTORAL**

**Marina Rubio Garrido**

**Madrid, 2021**

TESIS DOCTORAL

**Caracterización virológica,  
monitorización del VIH y análisis de  
marcadores inmunes en sangre seca de  
población pediátrica y adulta de Kinshasa,  
República Democrática del Congo.**

Esta memoria ha sido presentada para optar al grado de Doctor en Microbiología por la Universidad Autónoma de Madrid por la licenciada:

**Marina Rubio Garrido**

Directora de Tesis:

**Dra. África Holguín Fernández**

Doctora en Biología. Investigadora del Sistema Nacional de Salud.  
Responsable del Laboratorio de Epidemiología Molecular del VIH-1.  
Servicio de Microbiología y Parasitología. Hospital Universitario  
Ramón y Cajal, Madrid.

V.º B.º de la Directora de Tesis:

*A mis padres, por ser mi ejemplo*

# Agradecimientos



Para empezar, agradecer al Dr. Cantón por permitirme formar parte del Servicio de Microbiología y Parasitología del Hospital Universitario Ramón y Cajal. A Juan Carlos y José María por prestarme siempre su ayuda y haberme enseñado tanto. Gracias a todos mis compañeros del servicio por recibirme, siempre con una sonrisa y con la mano tendida, para ayudarme en lo que hiciera falta, en especial a Blanca, Laura, Esther, Ainhize, Chema y Conchi. Gracias a todos los miembros del IRYCIS por el soporte constante.

Gracias a todas las asociaciones que han creído en el proyecto de Epimol y han hecho posible nuestra investigación. Mención especial a Bomberos Ayudan porque hacen el mundo mejor.

Gracias a cada uno de los compañeros que han sido y son parte de Epimol, de todos he aprendido algo nuevo que me han ido haciendo crecer. Gracias a Miguel por ser un compañero siempre dispuesto a ayudar y por enseñarme a enseñar, a Ana Valadés por llenar todo el laboratorio de carcajadas, chocolate y ayuda constante, a Ana Rodríguez por su compañerismo, cercanía y audios que quedarán grabados en nuestra memoria. Gracias y mil gracias a África por esa entrega, vocación y entusiasmo absoluto. Por enseñarme a luchar y nunca nunca rendirme ante los ~~problemas~~ retos. Pero, por si fuera poco, eres aún más grande como persona. Haces tuyos los problemas de los demás y luchas por ellos al máximo. Por cuidarme tantísimo, por permitirme crecer personal y profesionalmente, por no dejarme caer nunca y por absolutamente TODO. Creo que es imposible tener una jefa mejor que tú, te voy a echar mucho de menos.

Gracias a cada uno de los grandes profesionales con lo que he podido trabajar y aprender de ellos durante estos años. A Gabi y Silvia, colaboradores incansables, haciendo fácil lo difícil. Este proyecto no hubiera sido posible sin vosotros. A todo el equipo de Monkole, con Adolphe a la cabeza por enseñarme y acogerme. A Eunice por tratarme como una hermana nada más llegar y mostrarme otra Kinshasa. A todas mis chicas de la UNAV y a todas las que me acogieron en Oloma, hicisteis mi primera experiencia en África, una experiencia inolvidable y enriquecedora.

Gracias a Lorant Hatvani por ser mi primer contacto con la ciencia, por enseñarme a trabajar y por esas reuniones con Unicum en mano que nunca olvidaré.

A cada uno de mis Biologos, sois ejemplo de trabajo, actitud y talento. Con vosotros la ciencia (espero que española) y la innovación tiene un futuro brillante. A mis Blanditas por apoyarme en los momentos duros y hacerlos pequeños con una simple conversación de WhatsApp. Porque esa confianza y apoyo mutuo nunca se pierda. A Ali, mi loca imparable, por llenar de magia y risas a todo el que está a tu lado. A Ana por estar ahí antes de que te llame. Encontrar a alguien con la que tener tanta complicidad y confianza es muy difícil, gracias por cuidarme tanto.

## AGRADECIMIENTOS

---

A Cris y Belén por estar ahí desde que recuerdo. Tan distintas y tan imprescindibles en mi vida. Sabéis lo importante y especiales que sois para mí.

A los Rubio y los Garrido por alegrarse por mis logros y regalarme tan buenos momentos. Siempre estáis a mi lado a pesar de la distancia. Gracias a Julina por ser ejemplo incansable de lucha y fuerza, te voy a echar mucho de menos.

A Carlos, por cuidarme, quererme y ser mi soporte día tras día. Porque contigo a mi lado sé que todo va a ir bien.

A mi padre, por enseñarme a vivir y disfrutar de las pequeñas cosas. Por tus charlas sinceras, tu cariño y por ese ¡nunca peor! A mi madre, por ser ejemplo de esfuerzo, de trabajo y de generosidad. Porque soy quien soy por todo lo que me has enseñado. Gracias por todo lo que has sacrificado por cuidarme, educarme y darme lo mejor de ti. A mi hermana Sara, por ser mi compañera de vida, mi pequeña debilidad y mi gran apoyo pese a la distancia. Os quiero mucho.

# Abreviaturas

<b>μl</b>	microlitros
<b>aa</b>	aminoácido(s)
<b>ACP</b>	Análisis de componentes principales
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>ANRS</b>	Agencia Francesa para la Investigación del SIDA y Hepatitis virales
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	ARN mensajero
<b>ARV</b>	Fármacos antirretroviral(es)
<b>BCG</b>	Vacuna frente al Bacilo Calmette-Guérin (tuberculosis)
<b>CCI</b>	Coeficiente de correlación intraclase
<b>cp/círculo</b>	copias de ARN del VIH-1 por círculo de DBS
<b>cp/ml</b>	copias de ARN del VIH-1 por mililitro de plasma
<b>CRF</b>	Forma(s) recombinante(s) circulante(s)
<b>Ct</b>	<i>Cycle threshold</i> o ciclo específico
<b>CV</b>	Carga viral
<b>d</b>	distancia genética
<b>DBS</b>	<i>Dried blood spots</i> o muestras de sangre seca
<b>DE</b>	Desviación estándar
<b>DTP</b>	Vacuna de difteria, tétanos y tosferina
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EE.UU.</b>	Estados Unidos de América
<b>Fig. Sup.</b>	Figura suplementaria
<b>HepB</b>	Vacuna frente a hepatitis B
<b>Hib</b>	Vacuna anti- <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b (meningitis)
<b>IC</b>	Intervalo de confianza
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>IP</b>	Inhibidores de la proteasa
<b>IN</b>	Integrasa

<b>INI</b>	Inhibidores de la integrasa
<b>ITIAN</b>	Inhibidores de la retrotranscriptasa análogos de nucleós(t)ido
<b>ITINAN</b>	Inhibidores de la retrotranscriptasa no análogos de nucleós(t)ido
<b>ITS</b>	Infecciones de transmisión sexual
<b>kb</b>	kilobases
<b>LD</b>	Límite de detección
<b>LQ</b>	Límite de cuantificación
<b>LANL</b>	Base de datos de Los Álamos
<b>log</b>	logaritmo decimal
<b>LTR</b>	Repeticiones largas terminales
<b>min</b>	minuto(s)
<b>ml</b>	mililitro(s)
<b>MDR</b>	Mutaciones de resistencia
<b>ML</b>	Método de máxima verosimilitud
<b>MRA</b>	Mutaciones de resistencia adquiridas
<b>MRT</b>	Mutaciones de resistencia transmitidas
<b>ns</b>	estadísticamente no significativo
<b>nt(s)</b>	nucleótido(s)
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>ONUSIDA</b>	Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA
<b>p</b>	p-valor
<b>pb</b>	pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>Phy</b>	análisis filogenético
<b>Pneumo</b>	Vacuna antineumocócica, <i>Streptococcus pneumoniae</i> (neumonía)
<b>PR</b>	Proteasa
<b>PTMH</b>	Programa de prevención de la transmisión del VIH materno-infantil
<b>PNLS</b>	Programa Nacional de lucha contra el VIH-SIDA

<b>qPCR</b>	PCR cuantitativa
<b>RDC</b>	República Democrática del Congo
<b>RIC</b>	Rango intercuartílico
<b>Roche-CV</b>	COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test v2.0.
<b>Rota</b>	Vacuna frente rotavirus
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>RT</b>	Retrotranscriptasa
<b>RT-PCR</b>	PCR a tiempo real
<b>RT-qPCR</b>	PCR cuantitativa de transcripción inversa
<b>s</b>	Segundo(s)
<b>sec</b>	Secuencia(s)
<b>sida</b>	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
<b>TAR</b>	Tratamiento antirretroviral
<b>TB</b>	Tuberculosis
<b>URF</b>	Forma(s) recombinante(s) única(s)
<b>VIH</b>	Virus de la inmunodeficiencia humana
<b>VIH+</b>	Paciente infectado por VIH
<b>VIS</b>	Virus de la inmunodeficiencia del simio
<b>WB</b>	<i>Western blot</i>
<b>Xpert-CV</b>	Cepheid Xpert HIV-1 VL
<b>Xpert-Qual</b>	Cepheid Xpert HIV-1 Qual
<b>VAA</b>	Vacuna frente a la fiebre amarilla
<b>VAR</b>	Vacuna frente a rubeola
<b>VPO/I</b>	Vacuna antipoliomelítica oral/inactivada
<b>VPN</b>	Valor predictivo negativo
<b>VPP</b>	Valor predictivo positivo
<b>vs.</b>	<i>versus</i>

## Fármacos Antirretrovirales frente al VIH

**Inhibidores de la proteasa (IP)** ("/r" indica coadministración con ritonavir en baja dosis como potenciador farmacológico)

<b>ATV/r</b>	Atazanavir sulfato
<b>DRV/r</b>	Darunavir
<b>FPV/r</b>	Fosamprenavir cálcico
<b>IDV/r</b>	Indinavir sulfato
<b>LPV/r</b>	Lopinavir
<b>NFV</b>	Nelfinavir
<b>SQV/r</b>	Saquinavir
<b>TPV/r</b>	Tipranavir

### Inhibidores de la retrotranscriptasa análogos de nucleós(t)ido (ITIAN)

<b>3TC</b>	Lamivudina
<b>ABC</b>	Abacavir
<b>AZT</b>	Zidovudina
<b>DDI</b>	Didanosina
<b>D4T</b>	Estavudina
<b>FTC</b>	Emtricitabina
<b>TDF</b>	Tenofovir disoproxil fumarato

### Inhibidores de la retrotranscriptasa no análogos de nucleós(t)ido (ITINAN)

<b>EFV</b>	Efavirenz
<b>ETR</b>	Etravirina
<b>DOR</b>	Doravirina
<b>NVP</b>	Nevirapina
<b>RPV</b>	Rilpivirina hidrocloreuro

### Inhibidores de la integrasa (INI)

<b>BIC</b>	Bictegravir
<b>DTG</b>	Dolutegravir

**EVG**            Elvitegravir

**RAL**            Raltegravir

## **Aminoácidos**

**A**      Alanina

**C**      Cisteína

**D**      Ácido aspártico

**E**      Ácido glutámico

**F**      Fenilalanina

**G**      Glicina

**H**      Histidina

**I**      Isoleucina

**K**      Lisina

**L**      Leucina

**M**      Metionina

**N**      Asparagina

**P**      Prolina

**Q**      Glutamina

**R**      Arginina

**S**      Serina

**T**      Treonina

**V**      Valina

**W**      Triptófano

**Y**      Tirosina



# ÍNDICES

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>Resumen .....</b>	<b>XVII</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>9</b>
Biología del VIH .....	11
Diversidad Genética y Evolución Molecular del VIH .....	13
Variantes Genéticas del VIH .....	14
Implicaciones de la Presencia de Variantes No-B del VIH-1 .....	18
Epidemiología del VIH .....	20
Epidemia del VIH en República Democrática del Congo .....	21
Curso Natural de la Infección .....	23
Diagnóstico de la Infección por VIH en Población Pediátrica .....	24
Limitaciones del Diagnóstico Molecular en Niños .....	28
Muestras de Sangre Seca (DBS, Dried Blood Spots).....	30
Tratamiento Antirretroviral.....	30
Monitorización de la Infección por VIH.....	33
Transmisión Vertical y Programas PTMH .....	36
Impacto del VIH en el Sistema Inmune .....	38
Mortalidad y Vacunación Infantil .....	39
<b>Objetivos .....</b>	<b>49</b>
<b>Materiales y Métodos .....</b>	<b>53</b>
Población de estudio .....	55
Preparación de muestras de sangre seca y plasma .....	56
Diagnóstico serológico y molecular del VIH y cuantificación de la viremia .....	56
Extracción de ARN, amplificación y secuenciación .....	59
Caracterización de la variante del VIH-1 .....	60
Descarga de secuencias de la base de datos de VIH de Los Álamos.....	62
Identificación de redes de transmisión .....	62
Análisis de diversidad genética .....	62
Análisis de mutaciones de resistencia a antirretrovirales.....	63
Biomarcadores inmunes probados .....	63
Cuantificación de biomarcadores por RT-PCR .....	64
Cuantificación de las Inmunoglobulinas G protectoras frente a 6 patógenos vacunables.....	65
Análisis estadístico .....	66
Números de acceso .....	67
Aspectos éticos.....	67
<b>Capítulo 1: Utilidad de las técnicas POC Xpert HIV-1 para la detección y cuantificación de recombinantes complejos del VIH-1 en Kinshasa, RDC .....</b>	<b>69</b>

Justificación y Objetivos .....	71
Resultados .....	72
Discusión .....	81
Divulgación .....	87
<b>Capítulo 2:</b> Actualización y evolución molecular de la epidemia del VIH-1 en población pediátrica y adulta de Kinshasa, RDC .....	89
Justificación y Objetivos .....	91
Resultados .....	92
Discusión .....	103
Divulgación .....	108
<b>Capítulo 3:</b> Los altos niveles de resistencia a los ARV comprometen el control del VIH en población pediátrica y adolescente en Kinshasa, RDC .....	111
Justificación y Objetivos .....	113
Resultados .....	114
Discusión .....	122
Divulgación .....	125
<b>Capítulo 4:</b> Estudio piloto del efecto de la exposición al VIH sobre el perfil inmunitario y la inflamación en población pediátrica .....	127
Justificación y Objetivos .....	129
Resultados .....	130
Discusión .....	134
Divulgación .....	138
<b>Capítulo 5:</b> Evaluación del grado de inmunización frente a seis patógenos vacunables en niños de Kinshasa, RDC .....	141
Justificación y Objetivos .....	143
Resultados .....	145
Discusión .....	155
Divulgación .....	163
<b>Infografía</b> .....	163
<b>Discusión Integradora</b> .....	171
<b>Conclusiones</b> .....	181
<b>Bibliografía</b> .....	187
<b>Anexo I:</b> Material suplementario de Materiales y Métodos .....	209
<b>Anexo II:</b> Material suplementario del Capítulo 1 .....	217
<b>Anexo III:</b> Material suplementario del Capítulo 2 .....	221
<b>Anexo IV:</b> Material suplementario del Capítulo 3 .....	235
<b>Anexo V:</b> Publicaciones .....	243
<b>Anexo VI:</b> Recursos en internet .....	331

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla I.1.</b> Métodos directos para la detección de la infección por VIH-1.....	26
<b>Tabla I.2.</b> Indicaciones actuales de la PCR como diagnóstico del VIH. ....	27
<b>Tabla I.3.</b> Estabilidad de los distintos tipos de muestra a varias temperaturas y tiempos para realizar cuantificación de la carga viral del VIH.....	30
<b>Tabla I.4.</b> Evolución y situación de la eliminación de la transmisión materno-infantil .....	37
<b>Tabla II.1.</b> Distribución de las muestras de Kinshasa utilizadas en esta Tesis. ....	55
<b>Tabla II.2.</b> Características de los ensayos moleculares para diagnóstico del VIH-1 y la cuantificación de la carga viral. ....	58
<b>Tabla II.3.</b> Valores de corte de los ensayos VirClia IgG (Vircell) para plasma/suero. ....	65
<b>Tabla 1.1.</b> Características de la población de estudio de Kinshasa (RDC) con DBS tomados en 2016.....	73
<b>Tabla 1.2.</b> Niños y adultos de Kinshasa con falso diagnóstico de VIH positivo en RDC tras emplear pruebas serológicas rápidas. ....	76
<b>Tabla 1.3.</b> Cuantificación de la CV del VIH-1 en 84 DBS de 14 niños y 70 adultos con VIH usando dos ensayos moleculares. ....	77
<b>Tabla 2.1.</b> Principales características de la población infectada por VIH-1 en Kinshasa (RDC) con secuencias disponibles (2016-2018). ....	93
<b>Tabla 2.2.</b> Identificación de grupos de transmisión en la cohorte de Kinshasa (2016-2018).....	97
<b>Tabla 2.3.</b> Descripción de la red de recombinación encontrada entre las 165 variantes del VIH circulantes en Kinshasa durante 2016-2018. ....	98
<b>Tabla 2.4.</b> Diversidad genética por grupos de estudio en secuencias <i>pol</i> del VIH-1 de RDC....	102
<b>Tabla 3.1.</b> Características demográficas y virológicas de niños y adolescentes de la cohorte de estudio con secuencias de VIH disponible. ....	115
<b>Tabla 4.1.</b> Principales características de los grupos pediátricos de estudio. ....	130
<b>Tabla 4.2.</b> Análisis de componentes principales de diez marcadores inmunes en 30 muestras de la cohorte pediátrica del estudio. ....	131
<b>Tabla 5.1.</b> Características de la población de estudio de Kinshasa (RDC) con plasma y/o DBS disponible .....	145
<b>Tabla 5.2.</b> Resultados de las pruebas VirClia®IgG para la detección de IgG protectoras contra 6 patógenos responsables de enfermedades prevenibles mediante vacunación utilizando sangre seca de 42 pacientes pediátricos. ....	148
<b>Tabla 5.3.</b> Número de pacientes inmunizados según su estadio VIH entre los 42 con plasma disponible.....	154
<b>Tabla Suplementaria I.1.</b> Secuencias de cebadores usados en RT-qPCR para medir los marcadores inmunes del Capítulo 4. ....	215

<b>Tabla Suplementaria II.1.</b> Sobreestimación de la CV considerando los ensayos cuantitativos y las variantes del VIH-1 definidas por análisis filogenético. ....	219
<b>Tabla Suplementaria III.1.</b> Resumen de publicaciones con caracterización de variantes del VIH-1 de RDC. ....	231
<b>Tabla Suplementaria IV.1.</b> Pacientes portadores de MDR a familias de ARV en la población de estudio: niños (0-14 años), adolescentes (15-21 años) y total. ....	237
<b>Tabla Suplementaria IV.2.</b> Mutaciones de Resistencia en niños (0-14 años) y adolescentes (15-21 años) con secuencias disponibles. ....	238

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura I.1.</b> Estructura del virión (A) y genoma del VIH (B). ....	12
<b>Figura I.2.</b> Ciclo replicativo del VIH. ....	13
<b>Figura I.3.</b> Clasificación de las variantes del VIH. ....	16
<b>Figura I.4.</b> Distribución geográfica de subtipos y algunos recombinantes del VIH-1 (A), prevalencia a nivel global entre 2010 y 2015 (B), y su evolución durante 1990-2015 (C). ....	17
<b>Figura I.5.</b> Evolución de las variantes del VIH-1 en República Democrática del Congo 1990-2015. ....	18
<b>Figura I.6.</b> Distribución de nuevas infecciones (15-49 años) por VIH en 2018 en Europa central/occidental y América del norte (A) y en África central y occidental (B) según grupo de población de riesgo. ....	20
<b>Figura I.7.</b> Situación de la transmisión materno infantil en África central y occidental (2017-2019). ....	21
<b>Figura I.8.</b> Progreso de los objetivos 95-95-95 en RDC (2015-2019) (A) y porcentaje de diagnóstico y tratamiento en la población total de RDC en 2019 (B). ....	22
<b>Figura I.9.</b> Curso natural de la infección por VIH. ....	23
<b>Figura I.10.</b> Algoritmo de diagnóstico de RDC para población con una prevalencia menor del 5%. ....	28
<b>Figura I.11.</b> Tasas de mortalidad infantil y número de muertes a nivel global en 2019 (A) y número de muertes estimadas en menores de 5 años por regiones en 2019-2030 (B). ....	40
<b>Figura I.12.</b> Distribución global de las muertes entre niños menores de 5 años por causa en 2018. ....	41
<b>Figura I.13.</b> Tasa de muertes por cada 100.000 personas por enfermedades vacunales en RDC según edad en 2019 (A) y número de muertes por años debidas a estas enfermedades (B). ...	42
<b>Figura I.14.</b> Diferencias de cobertura vacunal entre regiones geográficas. ....	43
<b>Figura I.15.</b> Evolución de la cobertura de 11 vacunas y su aparición a nivel global. ....	44
<b>Figura I.16.</b> Calendario vacunal infantil de RDC. ....	45
<b>Figura II.1.</b> Curva de amplificación de una RT-qPCR y sus elementos. ....	59

<b>Figura 1.1.</b> Correlación entre los ensayos Xpert-CV y Roche-CV en 78 muestras con VIH con CV cuantificada.....	78
<b>Figura 1.2.</b> Análisis Bland-Altman mostrando diferencias de la CV del VIH-1 media comparando Xpert-CV y Roche-CV en 78 pacientes infectados con muestras cuantificadas por ambos ensayos. ....	79
<b>Figura 1.3.</b> Diferencias en la CV del VIH-1 entre Xpert-CV y Roche-CV en 78 pacientes infectados y cuantificados por ambos ensayos y las variantes del VIH-1 en 58 muestras con secuencia disponible.....	80
<b>Figura 2.1.</b> Caracterización actual por epidemiología molecular en la cohorte de estudio del VIH-1 de Kinshasa, RDC, con DBS recolectados en 2016-2018.....	95
<b>Figura 2.2.</b> Estructura de recombinación de las secuencias <i>pol</i> disponibles clasificadas como URF, recuperadas de 39 pacientes infectados por VIH-1 en Kinshasa (2016-2018). ....	96
<b>Figura 2.3.</b> Comparación de las variantes del VIH-1 en la cohorte del estudio (2016-2018) frente a las secuencias LANL de RDC (1976-2012) y Kinshasa (1983-2008). ....	100
<b>Figura 2.4.</b> Tendencias temporales de la diversidad genética a lo largo de los años en las secuencias <i>pol</i> del VIH-1 de RDC.....	103
<b>Figura 3.1.</b> Tasa de pacientes infectados por virus con MDR a las principales familias de ARV en la población de estudio. ....	117
<b>Figura 3.2.</b> Mutaciones de resistencia en las principales familias de fármacos antirretrovirales en la población de estudio. ....	119
<b>Figura 3.3.</b> Pacientes VIH infectados portadores de MDR (A) y tendencias (B) según el tiempo de exposición al TAR en la población de estudio. ....	120
<b>Figura 3.4.</b> Predicción de la susceptibilidad a fármacos antirretrovirales según Stanford en pacientes con secuencias <i>pol</i> disponibles.....	121
<b>Figura 4.1.</b> Resultado gráfico del ACP de los perfiles de los biomarcadores inmunes en niños de RDC.....	131
<b>Figura 4.2.</b> Expresión de marcadores inmunes en niños infectados con VIH, niños expuestos y niños no expuestos de la población de estudio.....	133
<b>Figura 5.1.</b> Porcentaje de inmunización de los 42 pacientes pediátricos y adolescentes con plasma disponible. ....	146
<b>Figura 5.2.</b> Porcentaje de inmunización en 42 niños con muestras pareadas (plasma y DBS) considerando distintos <i>cut-off</i> . ....	151
<b>Figura 5.3.</b> Comparativa de porcentaje de inmunización en la población de estudio en 42 plasmas vs. 143 DBS, tomando los <i>cut-off</i> de máx. especificidad y óptimo. ....	152
<b>Figura 5.4.</b> Presencia de IgG protectoras en 140 pacientes con DBS según rango de edad empleando el <i>cut-off</i> de máxima especificidad. ....	153
<b>Figura 5.5.</b> Porcentaje de pacientes inmunizados frente a los 6 patógenos según la infección o no con VIH en los 143 niños y adolescentes empleando DBS y <i>cut-off</i> de máxima especificidad (A) y óptimo (B). ....	155

<b>Figura Suplementaria I.1.</b> Ficha clínica de los pacientes incorporados en el estudio desde los hospitales de Kinshasa. ....	211
<b>Figura Suplementaria I.2.</b> Localización y secuencia de los cebadores de la OMS (A) y ANRS (B). ....	213
<b>Figura Suplementaria I.3.</b> Mutaciones de resistencia (MDR) a las distintas familias de antirretrovirales en pacientes tratados según Stanford. ....	214
<b>Figura Suplementaria III.1.</b> Árbol filogenético que incluye 66 secuencias <i>pol</i> adscritas a subtipos puros en <i>pol</i> de DBS recolectados en 2016-2018 en Kinshasa y 5.672 secuencias de referencia de LANL. ....	223
<b>Figura Suplementaria III.2.</b> <i>Cluster</i> de transmisión número 1 identificado por árbol de máxima verosimilitud y modelo evolutivo GTR+I+G incluyendo un niño, un adolescente y una mujer de Kinshasa.....	224
<b>Figura Suplementaria III.3.</b> <i>Cluster</i> de transmisión número 2 identificado por árbol de máxima verosimilitud y modelo evolutivo GTR+I+G incluyendo dos adultos de Kinshasa. ....	225
<b>Figura Suplementaria III.4.</b> <i>Cluster</i> de transmisión número 3 identificado por árbol de máxima verosimilitud y modelo evolutivo GTR+I+G incluyendo dos adultos de Kinshasa. ....	226
<b>Figura Suplementaria III.5.</b> <i>Cluster</i> de transmisión número 4 identificado por árbol de máxima verosimilitud y modelo evolutivo GTR+I+G incluyendo dos niños de Kinshasa.....	227
<b>Figura Suplementaria III.6.</b> Red de transmisión de recombinación de 17 pacientes pediátricos de Kinshasa (2016-2018). ....	228
<b>Figura Suplementaria III.7.</b> Evento de recombinación identificado por máxima verosimilitud (PhyML) y el modelo evolutivo GTR+I+G con virus de 3 pacientes adultos de Kinshasa. ....	230
<b>Figura Suplementaria IV.1.</b> Susceptibilidad a antirretrovirales por Stanford en 27 niños (0-14) y 28 adolescentes (15-21) con secuencia disponible.....	239

# Resumen



The HIV pandemic already affects 38 million people in the world, and more than 90% of new HIV infections happen in Sub-Saharan Africa. A high genetic HIV diversity was observed in Kinshasa, the capital of the Democratic Republic of the Congo (DRC) and the epicentre of the HIV pandemic, with co-circulation of multiple and complex HIV variants. In this Thesis, we studied the HIV virus in infected people from Kinshasa, mainly in a pediatric population, with scarce knowledge related to their epidemiological characterization, antiretroviral resistance, immunity status, or vaccination coverage, among others. In our study we mainly used dried blood spots (DBS), as an alternative sample to plasma, for being easier to collect and ship to centralized facilities than plasma, evaluating its performance in different methodologies.

The main objectives of this Thesis were: 1) to evaluate the performance of new point-of-care (POC) molecular techniques for HIV diagnosis and quantification with a high diversity of HIV-1 recombinants; 2) to characterize the circulating HIV variants and their temporal trends in Kinshasa and the DRC; 3) to describe the drug resistance mutation prevalence and its therapeutic impact in HIV-infected pediatric patients; 4) to analyse the impact of HIV exposure and infection on immune profiles in children; 5) to analyse and quantify the presence of protective IgG antibodies against pathogens responsible of vaccine-preventable diseases.

We confirmed the utility of POC Xpert HIV-1 Tests for detection-quantification of complex HIV recombinants using DBS, identifying 8 false HIV+ diagnoses performed in DRC. We observed high correlation ( $R^2 = 0.89$ ) during viraemia quantification by using Cepheid-POC-Xpert-HIV-1VL and the non-POC-COBAS®TaqMan®HIV-1-Testv2, but showing clinically relevant  $\geq 0.5$  log VL differences in 15.4% of 78 cases among both assays. We presented the first data confirming the utility of Xpert HIV-1 tests for detection-quantification of unique HIV recombinant variants. We also provided unique and updated information related to HIV-1 variants currently circulating in Kinshasa, reporting the temporal trends of subtypes/CRF/URF during 43 years in the DRC. The main HIV variants founded in our cohort were A (26.7%), G (9.7%) and C (7.3%) and recombinants forms (12.7%/23.6% Circulant/Unique Recombinant Forms). We identified the first CRF47\_BF reported in Africa and 4 transmission clusters. A significant increase of subtype A and sub-subtype F1 and a significant reduction of sub-subtype A1 and subtypes D were observed during 2016-2018 compared with 1983 to 2008. Regarding HIV-infected pediatric patients under ART, 89.1% showed virological failure and 67.3% carried viruses with major-DRM to 1 (12.7%), 2 (47.3%) or 3 (5.5%) ARV-families. Most harboured DRM to NNRTI (73.5%) or NRTI (61.2 %), 8.3% major-DRM to PI and 15% minor-DRM to INI. Our results support the need for routine resistance monitoring for optimal ART and to control the spread of resistant HIV in the country.

Regarding respect to the immune biomarkers, HIV-infected children presented higher levels of 6 biomarkers (CD14, HVEM, B7.1, Siglec-10, HIF-1 $\alpha$ , and CD163) than the unexposed group. In exposed children, we found 6 biomarkers elevated (CD14, HVEM,

B7.1, Siglec-10, HIF-1 $\alpha$ , and IRAK-M) vs. unexposed children. Five biomarkers (CD14, HVEM, B7.1, Siglec-10, and HIF-1 $\alpha$ ) presented higher expression in both HIV+ and exposed children vs. unexposed group, with HVEM and CD14 overexpressed among HIV+ vs. exposed children. All these significant differences in specific biomarkers expression across groups strongly suggested an impact of HIV infection and/or HIV exposure on these immune biomarkers' expression. Lastly, the pediatric cohort from Kinshasa under study showed low immunization levels against diphtheria, tetanus, pertussis, measles, mumps and rubella, being lower in HIV-infected children vs. non-infected. We also established the cut-off values that provided optimal sensitivity and/or specificity in DBS for each infection.

Our data support the utility of DBS for HIV testing, immune markers quantification, and vaccination coverage monitoring in low-middle income countries. In these countries, live most new HIV-infected people live and the laboratory and sample management resources are limited.

La pandemia del VIH afecta ya a 38 millones de personas en el mundo, y más del 90% de las nuevas infecciones por VIH ocurren en África subsahariana. En Kinshasa, la capital de República Democrática del Congo (RDC) y epicentro de la pandemia del VIH, se observó una alta diversidad genética del VIH, con co-circulación de múltiples y complejas variantes del VIH. En esta Tesis se estudió el virus del VIH en población infectadas de Kinshasa, principalmente población pediátrica, con escaso conocimiento sobre su caracterización epidemiológica, resistencia antirretroviral, estado de inmunidad o cobertura vacunal, entre otros. En nuestro estudio utilizamos principalmente muestras de sangre seca (DBS), como alternativa al plasma, por ser más fácil de recolectar y enviar, y evaluamos su utilidad en diferentes metodologías.

Los principales objetivos de esta Tesis fueron: 1) evaluar las nuevas técnicas moleculares *point of care* (POC) para el diagnóstico y cuantificación del VIH con una alta diversidad de recombinantes del VIH-1; 2) caracterizar las variantes circulantes del VIH y sus tendencias temporales en Kinshasa y RDC; 3) describir la prevalencia de mutaciones de resistencia (MDR) a fármacos antirretrovirales (ARV) y su impacto terapéutico en pacientes pediátricos infectados por VIH; 4) analizar el impacto de la exposición y la infección por VIH en los perfiles inmunitarios de pacientes pediátricos; 5) analizar y cuantificar la presencia de inmunoglobulinas G (IgG) protectoras frente a patógenos responsables de enfermedades prevenibles por vacunación.

Confirmamos la utilidad de las pruebas POC Xpert HIV-1 para la detección y cuantificación de recombinantes complejos del VIH utilizando DBS, identificando 8 diagnósticos falsos positivos de VIH realizados en RDC. Observamos una alta correlación ( $R^2 = 0,89$ ) durante la cuantificación de la carga viral (CV) mediante el uso de la técnica POC, Cepheid Xpert HIV-1 CV y la prueba no POC COBAS TaqMan HIV-1 Test v2. Ambas técnicas mostraron diferencias clínicamente relevantes ( $CV \geq 0,5$  log) entre ambos ensayos en el 15,4 % de los 78 pacientes. Presentamos los primeros datos que confirman la utilidad de las pruebas Xpert HIV-1 para la detección y cuantificación de formas recombinantes únicas (URF) del VIH. También proporcionamos información única y actualizada relacionada con las variantes del VIH-1 que circulan actualmente en Kinshasa, informando de las tendencias temporales de los subtipos, CRF y URF durante 43 años en RDC. Las principales variantes del VIH encontradas en nuestra cohorte fueron A (26,7%), G (9,7%), C (7,3%), CRF (12,7%) y URF (23,6%). Identificamos el primer CRF47\_BF descrito en África y 4 grupos de transmisión. Se observó un aumento significativo del subtipo A y subtipo F1 y una reducción significativa del subtipo A1 y subtipo D durante el periodo de 2016-2018 en comparación con 1983-2008. En cuanto a los pacientes pediátricos infectados por el VIH en tratamiento antirretroviral (TAR), el 89,1% presentó fallo virológico y el 67,3% portaba virus con MDR principales en 1 (12,7%), 2 (47,3%) o 3 (5,5%) familias de ARV. La mayoría de las secuencias virales albergaba MDR a ITINAN (73,5%) o ITIAN (61,2%), el 8,3% tenían MDR principales a IP y el 15% MDR secundarias a INI. Nuestros resultados apoyan la necesidad de un análisis

de resistencias rutinarias para conseguir un TAR óptimo y para controlar la propagación de variantes del VIH resistentes en el país.

Respecto a los biomarcadores inmunes, los niños infectados por VIH presentaron niveles superiores de 6 biomarcadores (CD14, HVEM, B7.1, Siglec-10, HIF-1 $\alpha$  y CD163) que el grupo de niños no expuestos. En el grupo de niños expuestos, encontramos 6 biomarcadores elevados (CD14, HVEM, B7.1, Siglec-10, HIF-1 $\alpha$  e IRAK-M) frente a los niños no expuestos. Cinco biomarcadores (CD14, HVEM, B7.1, Siglec-10 y HIF-1 $\alpha$ ) presentaron mayor expresión tanto en los niños infectados por VIH como en los expuestos frente al grupo de no expuesto, con HVEM y CD14 sobreexpresados en los niños con VIH frente a los expuestos. Todas estas diferencias significativas en la expresión de biomarcadores específicos entre los grupos sugirieron un fuerte impacto de la infección y/o la exposición al VIH en la expresión de estos biomarcadores inmunes. Por último, la cohorte pediátrica en estudio mostró niveles bajos de inmunización frente a difteria, tétanos, tosferina, sarampión, paperas y rubéola, siendo más bajos en niños infectados por VIH que en niños no infectados. También establecimos los valores de corte que proporcionaron una sensibilidad y/o especificidad óptimas en DBS para cada infección.

Nuestros datos respaldan la utilidad de los DBS para diversas pruebas de diagnóstico y monitorización del VIH, de cuantificación de marcadores inmunitarios y de seguimiento de la cobertura de vacunación en países de bajos y medios recursos. En estos países, se dan la mayor parte de nuevas infecciones por VIH y tienen unos recursos sanitarios limitados.

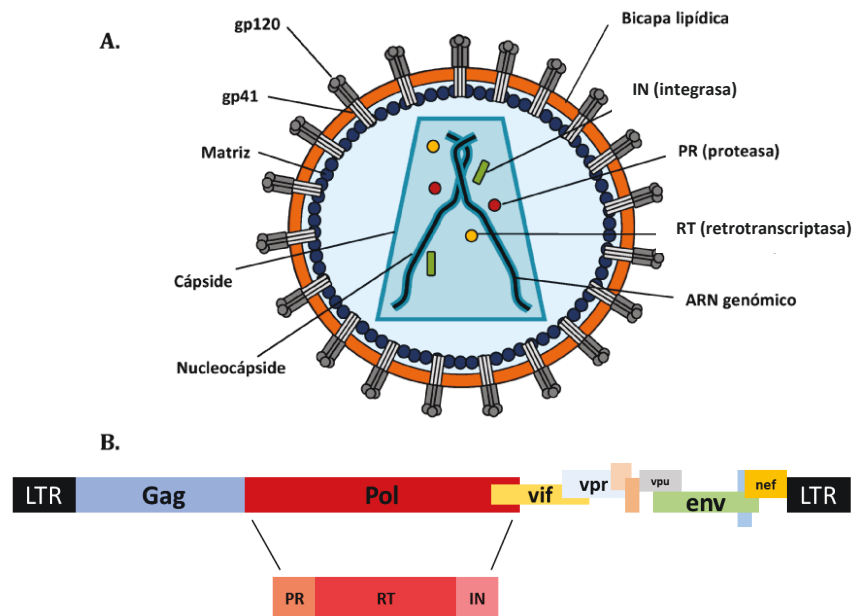
# Introducción

## BIOLOGÍA DEL VIH

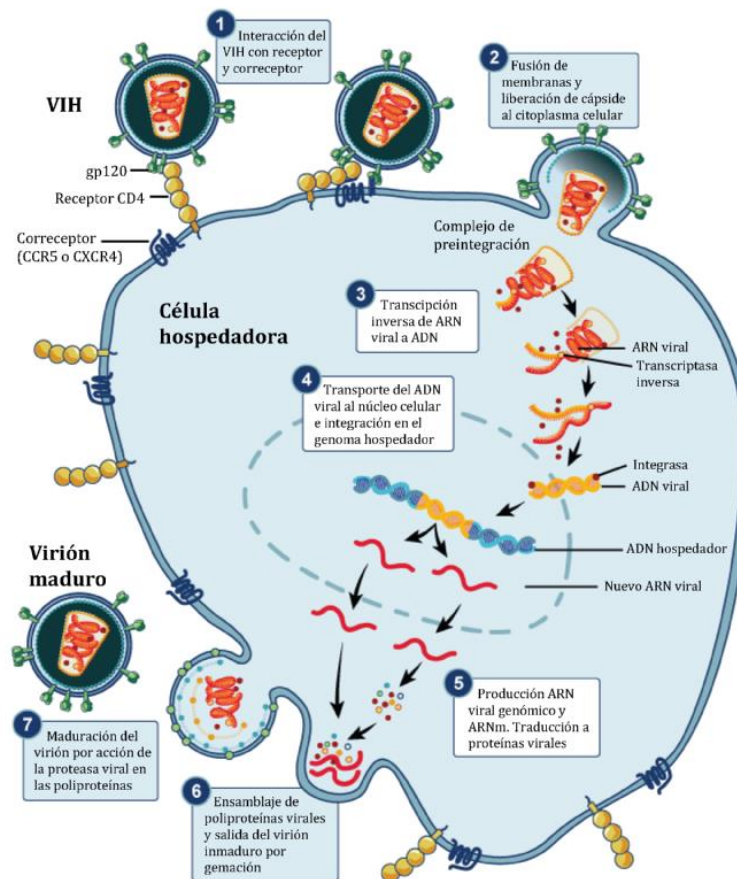
El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es el agente infeccioso causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida). Es un virus ARN de la familia de los retrovirus humanos (*Retroviridae*) y del género *Lentivirus*<sup>1</sup>. El virión tiene forma esférica y está formado por una envoltura externa o bicapa lipídica tomada de la membrana de la célula humana infectada, donde se inserta la glicoproteína Gp120 unida a la glicoproteína transmembrana Gp41 en forma de trímeros. Bajo la envoltura se sitúa la matriz proteica y en el interior se encuentra la cápside icosaédrica, que contiene las enzimas virales y el material genético del virus. Este está formado por dos cadenas sencillas de ARN de polaridad positiva de aproximadamente 9,8 kb asociadas a proteínas de la nucleocápside (**Fig. I.1A**)<sup>2</sup>.

El genoma del VIH contiene tres regiones codificantes principales: *gag*, *pol* y *env*, comunes a todos los retrovirus. El gen *gag* codifica principalmente las proteínas estructurales que conforman la matriz, la cápside y la nucleocápside. El gen *pol*, codifica las enzimas virales responsables de la maduración (proteasa, PR), de la síntesis de ADN a partir del ARN (retrotranscriptasa, RT) y de la integración del genoma del virus en el genoma celular (integrasa, IN). El gen *env* codifica el precursor de las glicoproteínas de la envoltura. Además, en el genoma del VIH hay otros seis genes adicionales (*tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* y *vpu*) con capacidad reguladora esencial para que se lleve a cabo el ciclo viral a través de las proteínas que codifican. En los extremos 5' y 3' del genoma se encuentran repeticiones largas terminales (LTR), que permiten su circularización e integración en el genoma celular (**Fig. I.1B**)<sup>3,4</sup>.

**Figura I.1. Estructura del virión (A) y genoma del VIH (B).**



El ciclo infeccioso y de replicación tiene varias etapas (**Fig. I.2**): 1) interacción del virus con la célula diana (principalmente linfocitos T CD4+) por la unión de la glicoproteína viral Gp120 con el receptor celular CD4 y de otras proteínas de membrana celular que actúan como correceptores de virus, entre las que destacan CCR5 y CXCR4; 2) fusión de las membranas viral y celular y liberación al citoplasma de la cápside viral; 3) transcripción inversa del ARN viral a ADN proviral, el cual se acopla a una serie de factores celulares y virales formando el complejo de preintegración; 4) transporte de este complejo al núcleo e integración en el genoma de la célula hospedadora por la acción de la IN viral y las secuencias LTR; 5) transcripción del ADN proviral usando la maquinaria celular, produciendo ARN genómico viral y ARNm viral requerido para la síntesis de proteínas virales. La traducción de este ARNm genera poliproteínas que deben procesarse en fragmentos funcionales; 6) las proteínas virales procesadas son ensambladas y el virión por gemación sale de la célula a través de la membrana celular; 7) maduración por la PR viral que procesa las poliproteínas precursoras para formar el virión infeccioso<sup>5</sup>.

**Figura I.2. Ciclo replicativo del VIH.**

**Leyenda Figura I.2.** Adaptado de *National Institutes of Allergy and Infectious Diseases*, EE.UU. (National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) HIV Replication Cycle <http://phil.cdc.gov/phil/details.asp>).

## DIVERSIDAD GENÉTICA Y EVOLUCIÓN MOLECULAR DEL VIH

De los virus descritos, el VIH es uno de los que presenta una mayor tasa evolutiva, es decir, un mayor número de cambios en el genoma por unidad de tiempo. La alta variabilidad genética del VIH es resultado de sus elevadas tasas de mutación y de recombinación, junto con su alta tasa de replicación. Se calcula que se producen y destruyen entre  $10^{10}$  y  $10^{12}$  nuevos viriones cada 2,5 días, que es el tiempo transcurrido entre generaciones virales<sup>6</sup>. Por cada ciclo replicativo y cadena de ARN viral se producen, aproximadamente, de 1 a 10 cambios de media y de 2 a 3 eventos de recombinación<sup>7,8</sup>. Dichas mutaciones permanecen en el genoma, ya que la RT carece de actividad correctora de errores y no elimina los nucleótidos (nts) erróneamente incorporados. Debido a la degeneración del código genético, que hace que a la mayoría de aminoácidos



(aa) les corresponda más de un codón de nts, hay mutaciones silenciosas o sinónimas (la sustitución del nts no produce cambio de aminoácido) y no silenciosas o no sinónimas (sí origina cambio de aminoácido)<sup>9</sup>. Dentro de un individuo infectado el virus se organiza como una población altamente heterogénea de distintas variantes genéticamente similares pero no idénticas. Esta estructura poblacional, denominada “cuasiespecie viral”, se caracteriza por un proceso constante de generación de mutantes, la competición entre ellos y la acción de eventos de selección positiva y/o negativa sobre las variantes generadas. Estos procesos tienen como resultado la dominancia del genoma o los genomas virales con mayor eficacia biológica o *fitness* (variante mayoritaria), acompañado de un amplio espectro de mutantes (variantes minoritarias) con un extenso rango de fenotipos<sup>10</sup>. Todas estas variantes del VIH tienen implicaciones clínicas y epidemiológicas importantes<sup>11,12</sup>. Asimismo, estos viriones pueden presentar distintos fenotipos respecto a virulencia, tropismo celular, velocidad de replicación, composición antigénica y susceptibilidad a los fármacos antirretrovirales (ARV). Todo ello, permite al virus la capacidad de seleccionar aquellas variantes que suponen una ventaja y así escapar a la presión selectiva que pudiera ejercer el sistema inmune o el tratamiento antirretroviral (TAR), por ejemplo.

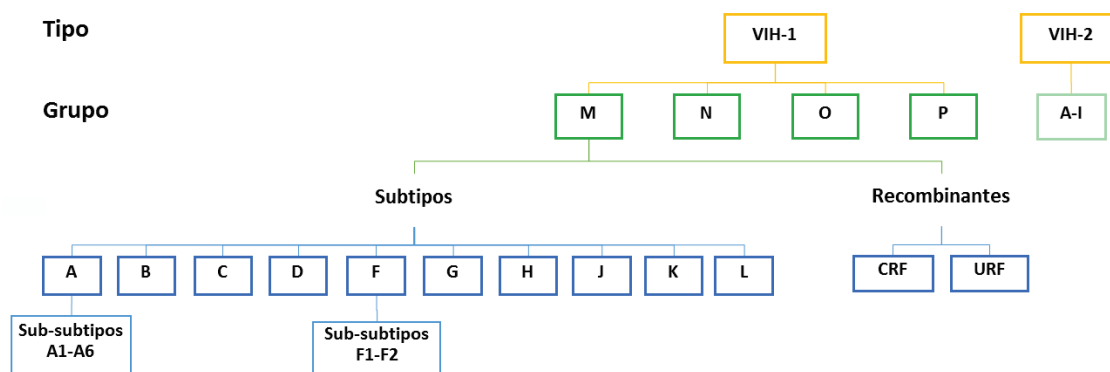
Para estudiar cómo evolucionan las poblaciones virales, es necesario medir la diversidad genética. Para determinar el grado de variabilidad de una población viral (población intra-huésped) o en cada paciente (población intra-huésped) es frecuente utilizar la distancia genética ( $d$ ), que es el número medio de diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias por sitio nucleotídico estudiado<sup>13</sup>.

## VARIANTES GENÉTICAS DEL VIH

La variabilidad del virus se traduce en la aparición de numerosas variantes virales (**Fig. I.3**), que son el objeto de estudio de la epidemiología molecular. Basándose en su homología genética, el VIH se clasifica en dos tipos: 1 y 2<sup>14,15</sup>. El VIH-1 es el más extendido y responsable de la mayoría de infecciones por VIH en el mundo. El VIH-2, identificado en 1986<sup>14</sup>, es más cercano filogenéticamente al virus de inmunodeficiencia del simio (VIS) que al VIH-1, parece ser menos patógeno y menos transmisible.

El VIH-1 ha sido clasificado en cuatro grandes grupos: grupo M (*main* o principal), grupo O (*outlier* o externo), grupo N (no-M, no-O) y el grupo P. Los grupos O, N y P presentan baja prevalencia y están restringidos a África subsahariana occidental y central o a casos aislados originarios de esa región. Solo el grupo M se ha expandido desde África al resto de continentes y es responsable del 97% de los cerca de 38 millones de infecciones a nivel mundial<sup>16</sup>. Los virus del grupo M han sido subdivididos en diez subtipos (A, B, C, D, F, G, H, J, K, L)<sup>15,17</sup>, así como recombinantes entre ellos, que llevan fragmentos genómicos de distintos subtipos de los viriones parentales. Estos últimos se originan por fenómenos de recombinación tras una coinfección viral (infecciones sucesivas) o una superinfección (infecciones simultáneas) por 2 o más subtipos diferentes del virus en un mismo hospedador. Esto suele ocurrir en lugares donde hay una alta tasa de infección por VIH-1 y circulan a la vez múltiples cepas del virus. El VIH-2 se ha clasificado en 9 grupos (A-I) y 2 recombinantes (CRF01\_AB y URF), siendo el grupo A, y en menor medida el B, los más frecuentes a nivel mundial<sup>18</sup>.

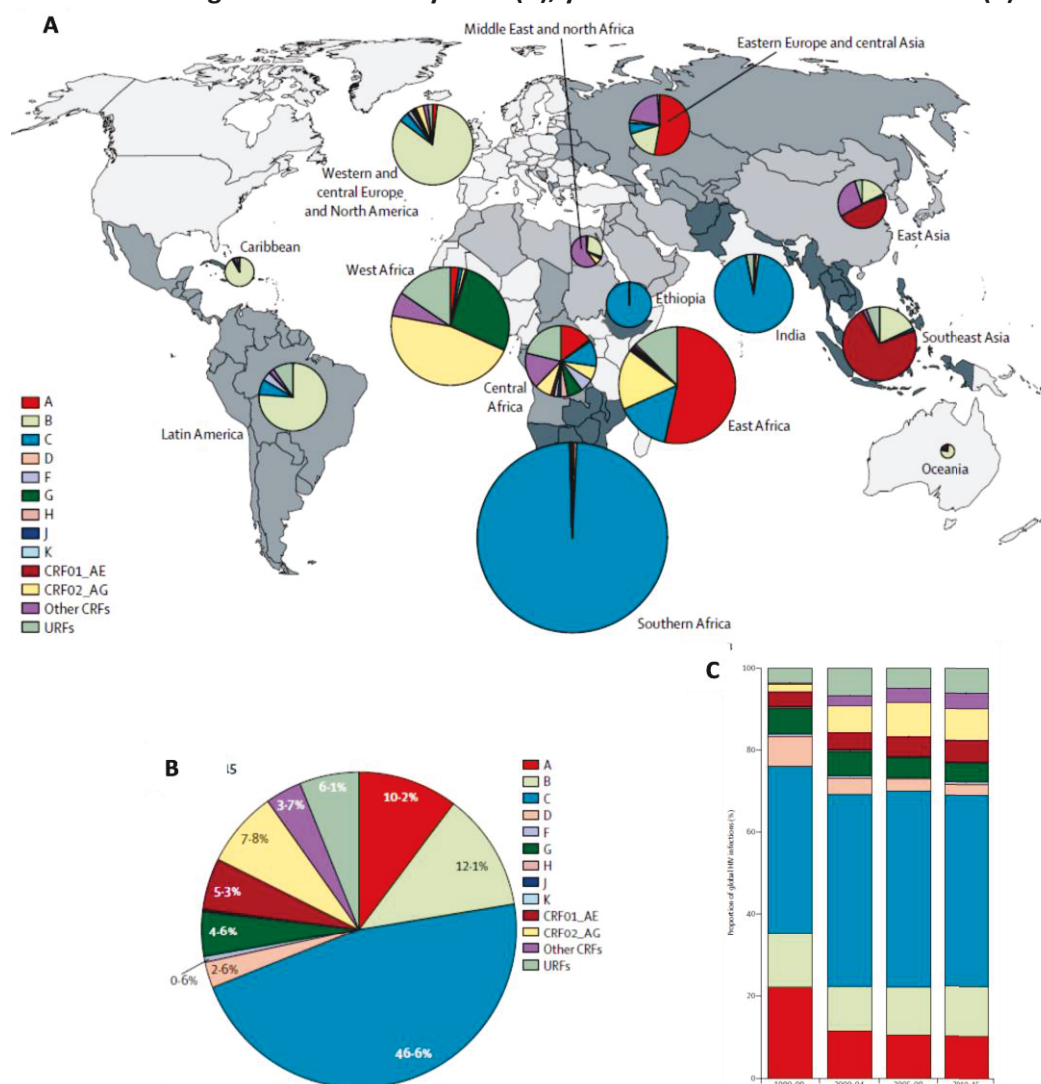
Estas formas recombinantes pueden ser circulantes (CRF, *circulating recombinant forms*) o únicas (URF, *unique recombinant forms*). Los CRF son recombinantes entre subtipos con secuencia completa, puntos de recombinación comunes y que han sido reconocidos en más de tres individuos infectados y no relacionados epidemiológicamente. Hasta el momento se han descrito 102 CRF<sup>19</sup>, identificados por un número y por los subtipos genéticos presentes en su genoma. Los URF son recombinantes intersubtipo encontrados en individuos aislados y con puntos de recombinación entre subtipos diferentes a los de los CRF conocidos, lo que no permite agruparlos con ellos. Si los URF se transmiten sucesivamente y se extienden entre la población, pueden dar lugar a nuevos CRF.

**Figura I.3. Clasificación de las variantes del VIH.**

La distribución mundial de las distintas variantes dentro del grupo M del VIH-1 es heterogénea<sup>20</sup> y, poco a poco, los límites geográficos entre subtipos van desapareciendo (**Fig. I.4A**). En África central, al ser el epicentro de la pandemia, coexisten un gran número de variantes. En el resto del mundo, la distribución del VIH-1 es probablemente debida a diferentes fenómenos de efecto fundador, es decir, la expansión de una variante concreta por ser la primera en llegar. Así, el subtipo C predomina en África del sur y oriental y también en la India; el subtipo A, en los países de la antigua Unión Soviética y el este de África; y su recombinante CRF01\_AE, en el este y sudeste asiático. En las áreas más industrializadas, como Europa occidental y Norteamérica, el subtipo B es el predominante. Este subtipo B es la variante más estudiada y utilizada como modelo para el diseño y desarrollo de fármacos, vacunas, ensayos diagnósticos, y de gran parte de la investigación básica, aunque supone solo el 12,1% de las infecciones por VIH-1 a nivel mundial.

A pesar de su prevalencia en estos países, los movimientos poblacionales comerciales, migratorios y turísticos han ido introduciendo variantes no-B del grupo M del VIH-1, tanto subtipos como formas recombinantes, en pacientes inmigrantes y autóctonos. Las variantes no-B del VIH-1 son responsables del 87,9% de los 38 millones de infectados a nivel mundial. La variante prevalente en el mundo es el subtipo C (46,6%), seguida de los CRF, que representan el 16,8% de las infecciones (**Fig. I.4B**). En cuanto a la evolución de las variantes desde 1990 hasta el 2015 se observó una disminución del subtipo A, un aumento del subtipo C, los CRF y URF (**Fig. I.4C**)<sup>20</sup>.

**Figura I.4. Distribución geográfica de subtipos y algunos recombinantes del VIH-1 (A), prevalencia a nivel global entre 2010 y 2015 (B), y su evolución durante 1990-2015 (C).**

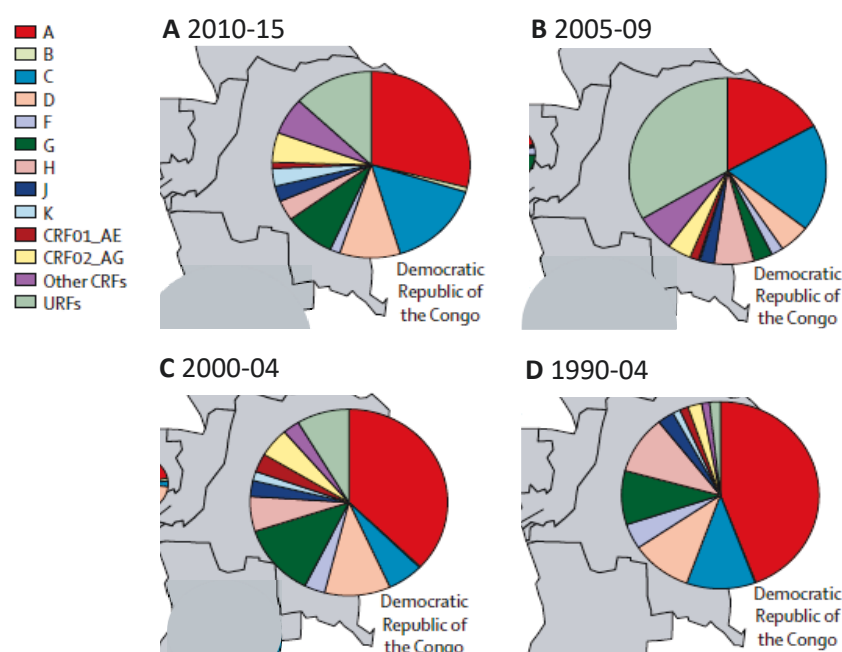


**Leyenda Figura I.4.** Figura adaptada de Hemelaar et al. 2019<sup>20</sup>.

La proporción de subtipos no-B y formas recombinantes del VIH-1 entre los nuevos diagnósticos se está incrementando en Europa<sup>21</sup> alcanzando incluso el 50% en Francia, Bélgica y Suecia<sup>22-26</sup>. En España, la proporción de variantes no-B también está en alza, y hoy suponen el 10-15% de las infecciones por VIH-1<sup>27-29</sup>. Por ello, se deben tener muy en cuenta estas nuevas variantes y formas recombinantes que provienen sobre todo de África central y que se están expandiendo por el resto del mundo. En pacientes pediátricos, la prevalencia de infección por variantes no-B del VIH-1 varía en función del país y del año de estudio. Son más prevalentes en África subsahariana, pero no existen suficientes estudios en esta población de muchos países africanos como ocurre en la República Democrática del Congo (RDC).

La mayor diversidad de variantes se encuentra en África central, donde están presentes todos los subtipos de VIH-1 y muchos CRF y URF. Con el tiempo, las infecciones por los subtipos A, D, G y H han disminuido y han aumentado las causadas por el subtipo C, por CRFs y URFs. En los escasos estudios que existen de RDC, predomina el subtipo A (28,9%), seguido del subtipo C (15,5%). En el periodo 2010-2015, África central tuvo la mayor proporción de URF (21,3%) que otras regiones africanas, contribuyendo a una proporción total de recombinantes del 46,8%<sup>20</sup>. En RDC una de cada cuatro infecciones son causadas por formas recombinantes que pueden aumentar hasta en un 53,5% en colectivos de riesgo, como en trabajadoras sexuales<sup>30</sup>. En los últimos años se ha observado un aumento de URF y de los subtipos A, C, D y K, con una disminución de ciertos subtipos, como el F y el H (**Fig. I.5**)<sup>20</sup>.

**Figura I.5. Evolución de las variantes del VIH-1 en República Democrática del Congo 1990-2015.**



**Leyenda Figura I.5.** Figura adaptada de Hemelaar et al. 2019<sup>20</sup>.

## IMPlicACIONES DE LA PRESENCIA DE VARIANTES NO-B DEL VIH-1

La correcta identificación de subtipos y formas recombinantes del VIH-1 es de gran relevancia para entender problemas potenciales en el diagnóstico genético y serológico<sup>31</sup>, en el uso de TAR<sup>32</sup>, en la cuantificación de la viremia<sup>11,33,34</sup>, en la interpretación genotípica de las mutaciones de resistencia (MDR)<sup>35-37</sup> y para

comprender la prognosis de la enfermedad<sup>38</sup> o fallos en la eficacia de vacunas<sup>39</sup>. A nivel poblacional, la cocirculación de múltiples cepas en una misma región geográfica dificulta la creación de vacunas específicas ante la imposibilidad de desarrollar inmunidad frente a un amplio rango de variantes<sup>39-41</sup>. Pacientes infectados por ciertos subtipos no-B presentan una progresión acelerada de la enfermedad<sup>38,42,43</sup> y tasas de transmisión diferente<sup>44</sup>. Los subtipos no-B y recombinantes del VIH-1 poseen, de manera natural, polimorfismos o marcadores genéticos específicos de variante a lo largo del genoma, incluyendo posiciones concretas de la PR, RT e IN asociadas a resistencia a los ARV. Estos polimorfismos pueden modular la capacidad replicativa del virus<sup>42</sup>, conducir a una sensibilidad reducida a esos compuestos<sup>45</sup>, seleccionar nuevas vías de adquisición de resistencia<sup>36</sup> o una adquisición más rápida de la misma<sup>46</sup>, modificar la interpretación de los algoritmos de interpretación de resistencia genotípica<sup>37</sup>, reducir la barrera genética para seleccionar resistencia a ciertos fármacos ARV<sup>47</sup>, modificar las afinidades de unión a los fármacos<sup>48</sup> o conferir una gran susceptibilidad a los inhibidores de la proteasa (IP) en subtipos no-B del VIH-1<sup>49</sup>.

Por ello, la presencia de subtipos no-B del VIH-1 no solo tiene implicaciones en el ámbito epidemiológico, sino también posiblemente importantes repercusiones clínicas y biológicas. A pesar de todo esto, existe una buena respuesta virológica e inmunológica al TAR en pacientes con subtipos no-B<sup>12,32</sup>.

Aunque los inmunoensayos de última generación pueden detectar todos los subtipos del grupo M del VIH-1, el grupo O y el VIH-2, en regiones con recursos limitados donde ocurren la mayoría de las infecciones y circulan una gran cantidad de variantes distintas del virus, las pruebas diagnósticas son menos eficientes<sup>31</sup>. La detección directa del virus mediante PCR empleada en la cuantificación de la carga viral (CV) o en el diagnóstico molecular precoz del VIH-1 requiere sondas y cebadores específicos para amplificar la región diana del virus. Estos, al estar diseñados principalmente para detectar cepas del subtipo B, pueden ser responsables de falsos negativos en pruebas diagnósticas de ciertos subtipos no-B o recombinantes complejos genéticamente diferentes de la cepa B<sup>50</sup>.

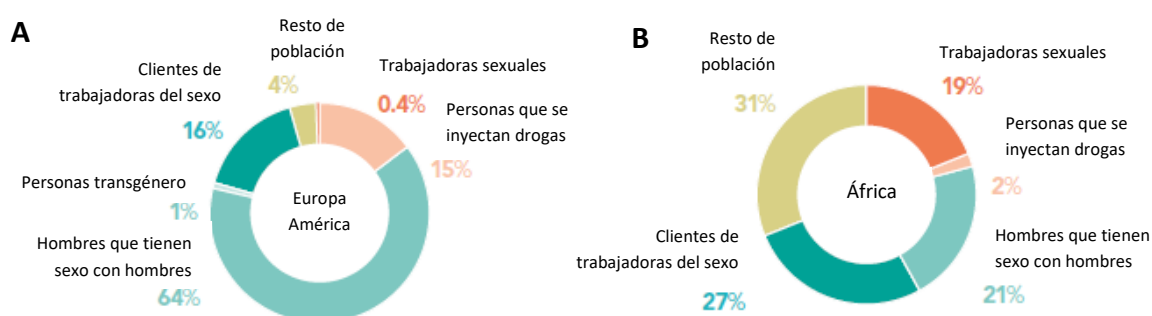
## EPIDEMIOLOGÍA DEL VIH

A finales de 2019, 38 millones de personas vivían infectadas por VIH en todo el mundo, siendo 1,8 millones niños menores de 15 años y 1,6 millones de adolescentes. África subsahariana fue la región más afectada, con 25,6 millones de infectados, el 59% de las nuevas infecciones y el 90% de los casos en niños y adolescentes<sup>51</sup>.

Hay grandes diferencias epidemiológicas según la zona geográfica. Por ejemplo, en Europa oeste y central y América del norte la mayor parte de la población (64%) infectada son hombres que tienen sexo con hombres, seguidos de clientes de servicios sexuales (16%). En África central y occidental, los hombres que tienen sexo con hombres solo suponen 21% de las personas que viven con VIH y el grupo mayoritario (31%) son población general (**Fig. I.6**)<sup>52</sup>

La combinación de los programas de prevención y tratamiento del VIH en África occidental y central no ha tenido un gran impacto en el control de la epidemia en la región. Las nuevas infecciones anuales por VIH han disminuido en un 25% y el número de muertes relacionadas con sida disminuyeron un 37% desde 2010 en esta región africana<sup>52</sup>. La distribución de nuevas infecciones por VIH en personas de 15 a 49 años en Europa central y occidental, en África central y occidental y los grupos de riesgo más castigados se muestran en la **Figura I.6**.

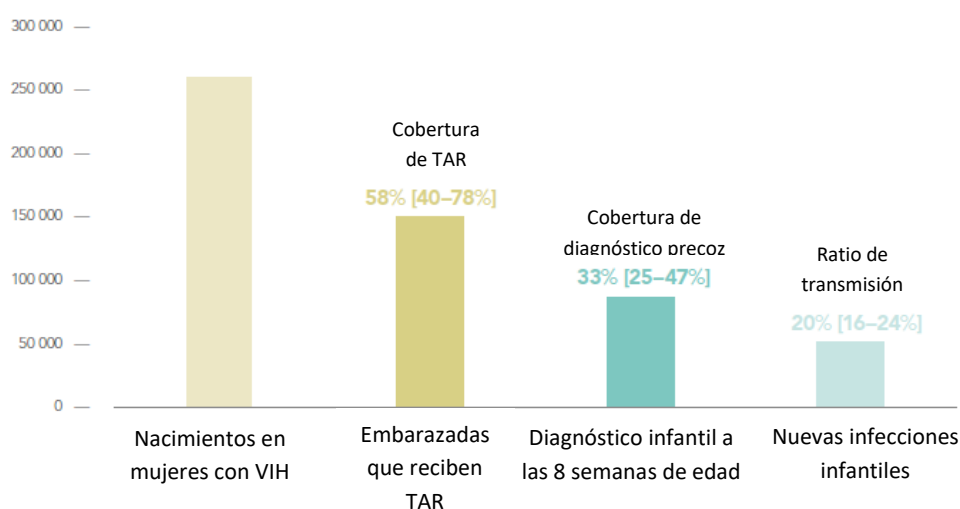
**Figura I.6. Distribución de nuevas infecciones (15-49 años) por VIH en 2018 en Europa central/occidental y América del norte (A) y en África central y occidental (B) según grupo de población de riesgo.**



**Leyenda Figura I.6.** Imagen adaptada de UNAIDS data 2020<sup>52</sup>.

En cuanto a la transmisión materno-infantil, el 42% de las nuevas infecciones por VIH en niños en esta región en 2019 se produjo porque las mujeres embarazadas VIH positivas no recibieron tratamiento antirretroviral (TAR) durante el embarazo y el 18% porque estas madres infectadas no recibieron medicamentos ARV durante la lactancia. La cobertura del diagnóstico precoz infantil en África central y occidental es tan solo de un 33% y el ratio de transmisión del VIH madre-hijo es de un 20% (**Fig. I.7**)<sup>52</sup>.

**Figura I.7. Situación de la transmisión materno infantil en África central y occidental (2017-2019).**



**Leyenda Figura I.7.** Adaptada de UNAIDS data 2020<sup>52</sup>.

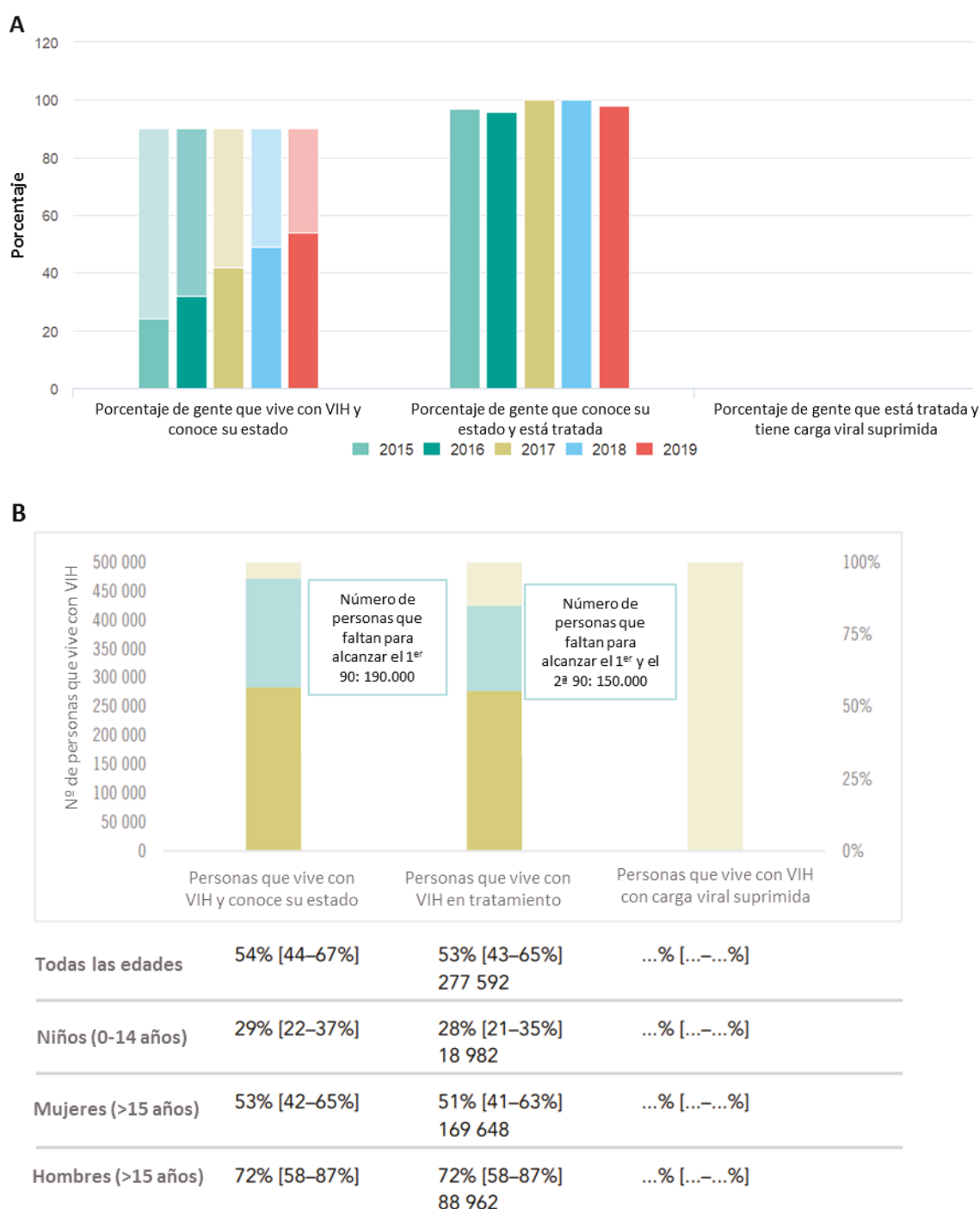
## EPIDEMIA DEL VIH EN REPÚBLICA DEMOCRÁTICA DEL CONGO

En RDC, el número estimado de niños y adultos infectados por VIH es de 520.000, siendo un 71,7% mujeres. Los nuevos infectados han ido disminuyendo en un 39% desde 2010, hasta llegar a los 23.000 en 2019. Hay una prevalencia de 0,8%, aunque se duplica en zonas urbanas, como en su capital, Kinshasa, llegando al 1,6%<sup>51</sup>.

Respecto a los objetivos del 95-95-95 de UNAIDS para 2030, en RDC solo un 54% de los infectados por VIH conoce su estado y el 98% de ellos tiene acceso al TAR, pero los datos de supresión virológica no están disponibles, por lo que no se conoce la eficacia del mismo (**Fig. I.8A**). Si ponemos estos datos en el contexto de las 520.000 personas que se estiman que están infectadas en el país, solo el 53% de adultos reciben TAR (**Fig. I.8B**)<sup>51</sup>.



**Figura I.8. Progreso de los objetivos 95-95-95 en RDC (2015-2019) (A) y porcentaje de diagnóstico y tratamiento en la población total de RDC en 2019 (B).**



**Leyenda Figura I.8.** Figuras adaptada de AIDSinfo (A)<sup>51</sup> y UNAIDS data 2020 (B)<sup>52</sup>

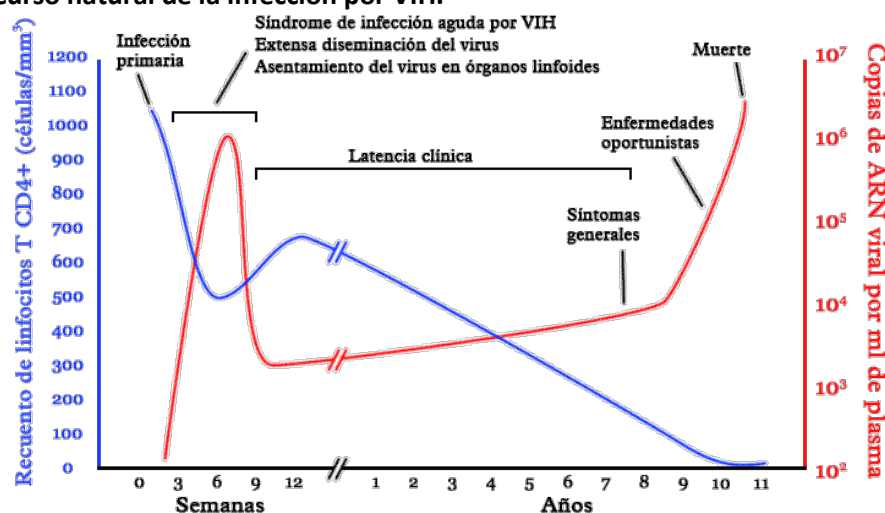
En cuanto a la infección por VIH en menores de 15 años en el país, los últimos datos de 2019 registraban 68.000 infectados; de ellos un 29% conocían su estado y un 28% estaban bajo TAR (**Fig. I.8B**). El diagnóstico precoz infantil solo era accesible en 2019 para un 16% de los niños infectados<sup>51</sup>.

## CURSO NATURAL DE LA INFECCIÓN

La infección por VIH transcurre como una infección viral persistente que causa replicación viral y enfermedad crónica<sup>53</sup>. Se pueden diferenciar varias fases de la infección por VIH, identificadas por un conjunto de síntomas e indicadores clínicos (Figura I.9).

La fase aguda, o infección primaria, se inicia en el momento del contagio. Durante los primeros días de la infección se produce una replicación masiva del virus dentro del organismo hasta alcanzar CV muy elevadas, infectando a células expuestas y a ganglios linfáticos. Después, se pasa a la fase crónica o de latencia clínica, coincidiendo con la aparición de la respuesta inmune y producción de anticuerpos (seroconversión). En ella, el portador es asintomático, porque su sistema inmune aún puede controlar la infección. En ausencia de TAR, la mayoría de los pacientes desarrollan sida en 5-10 años al mantener CV elevadas y deteriorarse su sistema inmune. En esta etapa crítica final de la infección por VIH el portador posee un sistema inmunológico muy debilitado y, por ello, baja su capacidad de reacción ante otras enfermedades e infecciones oportunistas, que le pueden conducir a la muerte. La mayoría de los pacientes que han desarrollado sida no sobreviven más de 3 años sin recibir TAR. La progresión de la enfermedad puede variar debido a factores asociados al virus y a factores genéticos e inmunológicos del hospedador, existiendo progresores rápidos y lentos<sup>54-56</sup>.

Figura I.9. Curso natural de la infección por VIH.



El curso natural de la infección por VIH-1 en edad pediátrica tiene particularidades propias<sup>57</sup>:

- La mayoría de los niños se infectan por transmisión vertical, en una etapa de desarrollo y diferenciación celular. El VIH provoca un grave trastorno de la inmunidad, que se manifiesta clínicamente por infecciones graves y por una mayor predisposición para el desarrollo de algunas neoplasias<sup>57</sup>.
- Los niños presentan una progresión a sida más rápida en ausencia de TAR<sup>58-60</sup> y una supervivencia media entre 7-8 años<sup>61,62</sup> frente a los 9,8-15 años de los adultos.
- Los niños que adquieren la infección en las últimas semanas del embarazo o en el momento del parto son asintomáticos al nacer. Los recién nacidos con síntomas clínicos que sugieren infección por VIH-1 tienen un elevado riesgo (40%) de progresar a sida antes del año<sup>60</sup>.
- El periodo de incubación de la infección por VIH-1 mediante transmisión vertical dura entre 4-5 meses de media. La sintomatología clínica es inespecífica y está asociada a una escasa ganancia de peso o detención del crecimiento<sup>63</sup>.
- En ausencia de TAR, la mortalidad asociada al VIH-1 es elevada durante el primer año (6-16%), decreciendo hasta los 7 años. La mitad de los niños que nacen infectados morirá antes de los 2 años de edad sin TAR<sup>64</sup>.
- El riesgo de padecer fracaso virológico a los 5 años de comenzar el TAR es el doble en niños que en adultos<sup>65</sup>.

## DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR VIH EN POBLACIÓN PEDIÁTRICA

En niños nacidos de madres con VIH, el diagnóstico precoz de la infección es esencial para instaurar el TAR lo antes posible, y reducir así la mortalidad y la morbilidad asociadas a la infección<sup>64,66,67</sup>. Puesto que la infección por VIH es asintomática o cursa con sintomatología inespecífica durante los 2-3 primeros meses de vida, el diagnóstico del VIH en niños mayores de 18 meses se realiza mediante técnicas serológicas, al igual que en el adulto<sup>68</sup>. Sin embargo, en niños menores de 18 meses expuestos a la infección durante el embarazo, parto o lactancia, se deben usar pruebas virológicas que detecten directamente el virus, su genoma o sus proteínas. Ello se debe a que los anticuerpos específicos frente al VIH-1 transferidos por vía transplacentaria por su madre pueden

interferir en la interpretación de las pruebas serológicas. Por eso, en ellos el diagnóstico serológico no es útil<sup>69</sup>.

Hasta ahora, las pruebas moleculares convencionales para diagnóstico precoz infantil y cuantificación de CV necesitaban procedimientos largos realizados en entornos de laboratorio especializados y centralizados, que requerían una infraestructura y una capacitación determinadas<sup>70,71</sup>. Además, los tiempos de comunicación de resultados en países con una infraestructura insuficiente pueden llegar a ser de varias semanas o incluso meses. Esto aumenta el riesgo de pérdida del seguimiento clínico de los pacientes, lo que tiene un impacto negativo en la cascada de tratamiento del VIH<sup>72,73</sup>.

Existen diferentes metodologías para realizar el diagnóstico directo de la infección por VIH-1 (**Tabla I.1**). Estas técnicas virológicas comerciales deben tener una sensibilidad al menos del 95% (ideal >98%) y una especificidad mayor del 98%<sup>69</sup>. No obstante, hasta la fecha, la Organización Mundial de la Salud (OMS) no ha mencionado ninguna técnica como referencia (*gold standard*) en sus guías<sup>69,74–76</sup>.

En los últimos años se han desarrollado técnicas moleculares denominadas *point-of-care* (POC) tanto para diagnóstico (cualitativas) como para cuantificación de CV (cuantitativas). Estas técnicas POC han surgido como alternativa para mejorar los programas de diagnóstico precoz infantil y para facilitar la monitorización de la eficacia de la terapia antirretroviral<sup>77</sup>. Las técnicas moleculares POC son plataformas automáticas más simples, más rápidas al obtener resultados en menos de 2 horas, lo que permite informar del resultado al paciente el mismo día de consulta o de toma de muestra. Además, no requieren tanta infraestructura ni capacitación como las técnicas convencionales de laboratorio no-POC para el diagnóstico y la cuantificación de la CV del VIH<sup>71,78</sup>. Se pueden realizar directamente en centros de salud, e incluso en unidades móviles y no solo en laboratorios de referencia, lo que favorece su uso acercando el punto de atención del paciente. Además, permiten la confirmación del VIH, el inicio del TAR o las intervenciones para mejorar la adherencia al TAR rápidamente, disminuyendo así las pérdidas de seguimiento de los pacientes. La OMS promueve el uso de las técnicas POC para el diagnóstico del VIH y monitorización de la eficacia del TAR en entornos de recursos limitados<sup>79</sup>.

**Tabla I.1. Métodos directos para la detección de la infección por VIH-1.**

### 1. Detección molecular del material genético del virus (ARN viral o ADN proviral)

#### A. Técnicas convencionales o clásicas

##### A.1. Técnicas cualitativas (presencia o ausencia de virus)

- Amplicor HIV-1 DNA Test v1.5 (RUO) (Roche Diagnostics)
- COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Qualitative Test (Roche Diagnostics)
- Real Time RUO Qualitative HIV-1 (Abbott)

##### A.2. Técnicas cuantitativas (cuantifican carga viral):

###### A.2.1. Amplificación por qPCR:

- COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Viral Load v 2.0 (Roche)
- RealTime HIV-1 m2000rt (Abbott)
- NucliSens EasyQ HIV-1 v2 (BioMérieux)
- Versant HIV RNA 1.0 (kPCR) (Siemens)
- Artus™ HIV-1 QS-RGD (Qiagen)

###### A.2.2. Amplificación empleando tecnología NASBA:

- NucliSens EasyQ HIV-1 v2.0 (bioMérieux)

###### A.2.3. Amplificación de una señal unida a moléculas de ARN viral o bDNA:

- Versant HIV-1 RNA v3.0 (Siemens)

#### B. Técnicas *point of care* (POC) o rápidas

##### B.1. Técnicas cualitativas (diagnóstico)

- Xpert HIV-1 Qual (Cepheid)
- SAMBA I and II HIV-1 Qual Whole Blood test (DRW)

##### B.2. Técnicas cuantitativas (cuantifican carga viral)

- Xpert HIV-1 Viral Load (Cepheid)
- SAMBA I and II HIV-1 Semi-Q Whole Blood Test and Plasma Test (DRW)

### 2. Cultivo del virus

### 3. Detección de antigenemia (antígeno p24 viral)

- Genscreen HIV-Ag (BioRad)
- Alliance HIV p24 ANTIGEN ELISA kit (Perkin Elmer)
- HIV-1 P24 ELISA KIT (Abcam)
- LYNX HIV p24 Antigen Assay (NWGHF) (POC)

### 4. Detección de la actividad transcriptasa inversa viral

- ExaVir Load versión 3.0 (Cavidi)

**Leyenda Tabla I.1.** Tabla adaptada del capítulo “Epidemiología Molecular del VIH” Máster en sida, Proyecto Esther, 2020. Cedida por la Dra. África Holguín. PCR, reacción en cadena de la polimerasa; qPCR, PCR en tiempo real; NASBA, nucleic acid sequence based amplification; bDNA, branched DNA. Ver más detalles de cada técnica en HIV/AIDS Diagnostics Technology Landscape 5<sup>th</sup> Edition 2015<sup>71</sup>.

La OMS recomienda que todos los niños expuestos menores de 18 meses realicen técnicas de detección de ARN viral o ADN proviral para el diagnóstico precoz de la infección por VIH a las 4-6 semanas de vida (o lo antes posible) y que sea posteriormente confirmado en otra muestra por técnicas moleculares. En niños mayores de 18 meses un test serológico positivo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) confirmado por un ensayo confirmatorio (*western blot* o WB) implica un diagnóstico positivo<sup>69</sup>. Los niños

no infectados nacidos de madres infectadas por VIH, pueden infectarse a través de la lactancia materna posterior y hasta que no finalice la lactancia no cesa el riesgo de infección. Por ello, la OMS recomienda realizar test diagnósticos moleculares al menos 6 semanas después de haber cesado la lactancia materna<sup>68</sup>. Si el test molecular es positivo, debería confirmarse por una técnica molecular en otra nueva muestra.

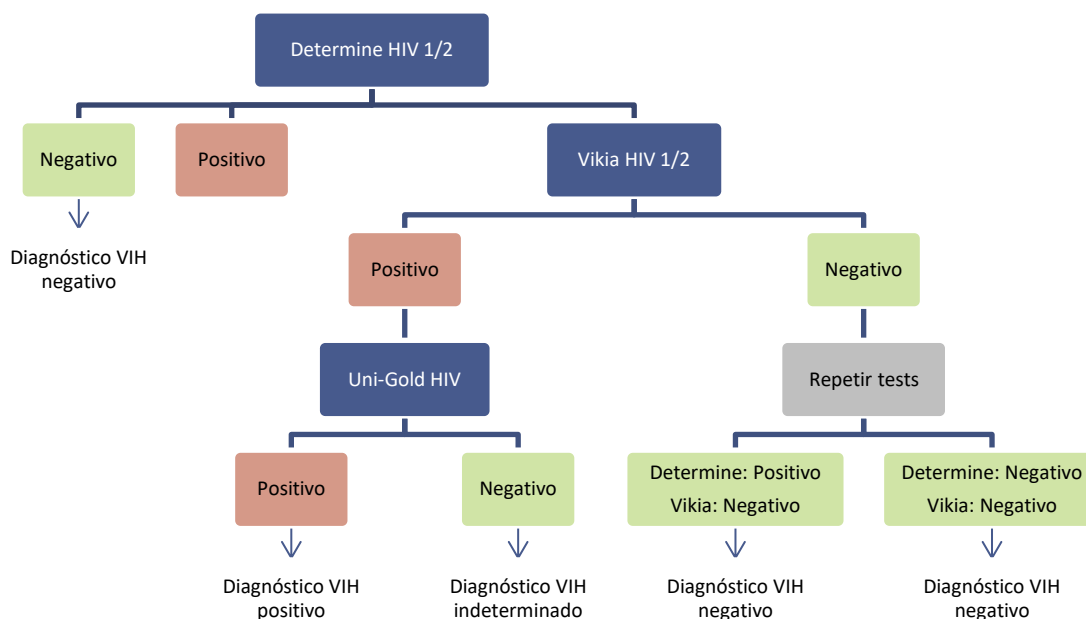
Las situaciones en las que la PCR resulta imprescindible para el diagnóstico de la infección por VIH se muestran en la **Tabla I.2**. En esos casos la PCR logra un diagnóstico más fiable y precoz de la infección por VIH que el diagnóstico serológico.

**Tabla I.2. Indicaciones actuales de la PCR como diagnóstico del VIH.**

1. En recién nacido de madres infectadas por VIH o con riesgo de infección por VIH durante el embarazo.
2. Para confirmar la infección en niños seropositivos menores de 18 meses.
3. En sujetos con patrón serológico indeterminado.
4. Para demostrar infecciones por VIH-2 con serología no concluyente o coinfecciones VIH-1/VIH-2.
5. En sujetos con infección aguda que todavía no han desarrollado anticuerpos frente al VIH.

El grado de estandarización de estas pruebas y la disponibilidad de reactivos no siempre es igual en los distintos países. Esto ocurre en RDC, donde existe un único laboratorio de referencia con capacidad de realizar estas pruebas PCR para todo el país. Esto supone que el envío, transporte, realización de la prueba y entrega de los resultados al centro de referencia tarde entre 3 y 4 meses e incluso que no llegue el resultado nunca. Esto puede provocar pérdidas de seguimiento de pacientes y un retraso en el diagnóstico precoz, muy necesario en el caso de los niños. El diagnóstico en RDC, generalmente, se realiza mediante un algoritmo que consta de tres test rápidos serológicos: Alere Determine HIV-1/2 (Abbott Laboratories, EE.UU.), Uni-Gold HIV (Michigan Regional Laboratory System) y Vikia HIV 1/2 (Biomerieux, France), como se indica en la **Figura I.10**. Como este algoritmo diagnóstico no es válido para niños menores de 18 meses, en su lugar, se realiza una PCR si hay infraestructura y reactivos disponibles.

**Figura I.10. Algoritmo de diagnóstico de RDC para población con una prevalencia menor del 5%.**



**Leyenda Figura I.10.** Algoritmo adaptado del protocolo del Hospital de Monkole, Kinshasa (RDC-2019).

## LIMITACIONES DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR EN NIÑOS

En 2019, solo el 16% de los niños nacidos de madres VIH infectadas tuvo acceso a un diagnóstico precoz<sup>51</sup>. Existen varios factores que pueden afectar a la eficacia de las técnicas de diagnóstico molecular basadas en la amplificación del material genético viral, necesarias en el diagnóstico precoz infantil. Estos factores que pueden tener influencia son:

- **Momento de adquisición de la infección.** Los niños pueden infectarse con VIH-1 durante el embarazo, parto o lactancia materna, y por transmisión sexual o parenteral. Los niños infectados en el útero generalmente tienen CV detectable en el nacimiento. Los infectados durante el parto tardan más tiempo en tener virus detectable<sup>80</sup>. Por ello, la sensibilidad de los métodos moleculares es menor si se realiza la prueba más cerca al momento del nacimiento. En niños infectados en el útero se puede detectar ARN viral y ADN proviral en sangre a las 48 horas de nacer, pero si se infectan en el parto pueden tardar de 1 a 2 semanas en ser detectables<sup>81</sup>. En general, a las 6 semanas se debería detectar el virus en la mayoría de los niños infectados en el parto.

- **Carga viral y límite de detección de la técnica.** La detección del ARN viral y del antígeno p24 depende de la replicación viral, que se inhibe por el TAR. Aunque se espera que el niño infectado tenga una alta CV, si el niño ha recibido profilaxis al nacer puede que su viremia se haya reducido a valores por debajo del límite de detección de las técnicas moleculares. Ello podría originar falsos negativos. Por eso, para el diagnóstico precoz en neonatos expuestos es más aconsejable realizar ensayos moleculares que detecten el ADN proviral en las primeras 4-6 semanas de vida.

- **Variabilidad genética viral.** La mayoría de las infecciones en niños ocurren en países donde circulan más variantes complejas del VIH-1, como en África subsahariana. El diseño de las técnicas de diagnóstico y de CV se basa principalmente en el subtipo B; no todos los ensayos virológicos detectan con la misma eficacia el resto de las variantes del VIH-1, sobre todo recombinantes complejos<sup>34,82,83</sup>.

- **Tasa de transmisión vertical del virus en el lugar de estudio.** A medida que disminuye la tasa de transmisión vertical, se reduce el valor predictivo positivo de una prueba de diagnóstico molecular del VIH-1<sup>84</sup>, aumentando así el número de falsos positivos.

- **Tipo y volumen de muestra.** La mayoría de técnicas de diagnóstico molecular y cuantificación de la CV requieren 0,5-1 ml de plasma o suero y ello exige tomar, al menos, 1-3 ml de sangre en el paciente, lo que no es fácil en neonatos, niños con malnutrición o con bajo peso. Por ello, en países de bajos recursos se ha empezado a extender el uso de la sangre seca recogida en papel (DBS, *dried blood spots*). Los DBS han mostrado ser una alternativa práctica al plasma o suero en el diagnóstico de niños menores de 18 meses<sup>85</sup>. Sin embargo, el pequeño volumen de muestra tomada en los DBS disminuye la sensibilidad del ensayo de CV. Además, para poder comparar los resultados de los DBS con los de plasma, se requiere una validación de cada técnica molecular empleando muestras pareadas de plasma y DBS y ajustar los resultados teniendo en cuenta el hematocrito de cada paciente. Sin embargo, los DBS se han empleado con éxito por nuestro grupo y por otros para diagnosticar el virus y monitorizar la infección en niños y adultos, incluida la CV<sup>85-89</sup>.



## MUESTRAS DE SANGRE SECA (DBS, DRIED BLOOD SPOTS)

La OMS recomienda el uso de DBS<sup>69,90,91</sup> para la monitorización de la infección por VIH-1 en programas de salud pública en países de recursos limitados<sup>85</sup>. Los DBS son útiles para el diagnóstico molecular precoz<sup>50,88,92-96</sup>, el diagnóstico serológico del virus<sup>97</sup>, caracterizar molecularmente la variante viral, monitorizar la eficacia del TAR al usarse para cuantificar la CV y para detectar las MDR<sup>85,86,98-105</sup>. También se han usado DBS para detectar eventos de fracaso virológico<sup>106</sup>.

Para tomar la muestra se realiza un pequeño pinchazo en el talón (neonatos) o dedo con una lanceta estéril, recogiendo unas pocas gotas de sangre del paciente en una tarjeta de papel de filtro especial<sup>69</sup>. Así se evita la venopunción, siendo una técnica de toma de muestra más segura, barata y con almacenamiento y transporte más sencillo que el de plasma, suero o sangre completa<sup>85,107-111</sup>. Los DBS, una vez secos, se pueden almacenar a temperatura ambiente durante periodos cortos, mandarlos a laboratorios de referencia o bien almacenarlos en el congelador a -20°C/-80°C hasta su uso. La **Tabla I.3** recoge la estabilidad de distintos tipos de muestra en diversas condiciones.

**Tabla I.3. Estabilidad de los distintos tipos de muestra a varias temperaturas y tiempos para realizar cuantificación de la carga viral del VIH**

Temperatura	37°C (condiciones de humedad)	15-30°C (temperatura ambiente)	4°C	-20°C	-70°C
Tiempo	<b>Sangre completa (venosa con EDTA)</b>				
	6 horas	6 horas	No aplicable	No aplicable	No aplicable
	<b>Plasma</b>				
	24 horas	24 horas	5 días	1 año	5 años
	<b>Sangre seca (DBS)</b>				
	1-2 semanas	1-2 semanas	2-52 semanas	3-36 meses	1 año

**Leyenda Tabla I.3.** Adaptada de Technical and operational considerations for implementing HIV viral load testing<sup>68</sup>.

## TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL

En el ciclo infectivo del VIH existen varios pasos clave que han sido elegidos para el diseño de ARV que bloqueen la replicación del virus. Las enzimas fundamentales del ciclo: RT, PR e IN (pasos 3, 7 y 4, **Fig. I.2**), son las dianas moleculares de las principales familias de ARV: inhibidores de la retrotranscriptasa análogos de nucleós(t)idos (ITIAN),

que actúan como terminadores de cadena o no análogos de nucleós(t)idos (ITINAN), que inhiben específicamente la RT del VIH-1; inhibidores de la proteasa (IP) e inhibidores de la integrasa (INI). La triple combinación de 2 ITIAN más un tercer fármaco (ITINAN, IP o INI) es la base del actual TAR. Se dispone de un amplio arsenal terapéutico de ARV.

Ya que, hasta el momento, es imposible la erradicación del VIH, los objetivos del TAR son conseguir una alta y duradera supresión de la replicación viral, preservar o restaurar la función del sistema inmunológico, minimizar la toxicidad a corto y largo plazo, minimizar la selección de resistencias, reducir la morbilidad y mortalidad asociada a la infección y mejorar la calidad de vida de las personas que viven con VIH. Varios ensayos clínicos han demostrado que el inicio rápido del TAR, el mismo día del diagnóstico o en la primera semana, favorece la retención de los pacientes en la asistencia e incrementa la proporción de pacientes con supresión virológica<sup>112,113</sup>.

A nivel global, a finales de 2019, 25,4 millones de personas recibían TAR, representando el 67% de las personas que viven con VIH en el mundo. Entre las mujeres embarazadas infectadas por VIH, el 85% recibió TAR gracias a los programas de prevención de la transmisión del VIH materno-infantil (PTMH). Sin embargo, la cobertura actual del TAR para los niños menores de 14 años es solo del 53%. En 2019 el 53% del total de personas infectadas por VIH en RDC recibieron TAR, pero esta cobertura bajó a un 28% en niños, a pesar de que hay unos de 115.000 niños y adolescentes infectados en el país<sup>51</sup>.

En RDC se recomienda TAR o profilaxis cuando el diagnóstico del VIH resulta positivo siguiendo el algoritmo de diagnóstico reflejado en la **Figura I.10**, según las recomendaciones del Plan Nacional de Lucha contra el VIH/sida de RDC. El TAR de primera línea recomendado para adultos y madres infectadas por VIH incluye zidovudina o tenofovir (AZT o TDF), lamivudina (3TC) y nevirapina o efavirenz (NVP o EFV). Para la profilaxis de los neonatos se recomienda la combinación de AZT, 3TC y NVP desde el nacimiento, incluso antes de tener un diagnóstico molecular definitivo. Estos protocolos se han visto modificados a partir de abril de 2019, cuando cambiaron las pautas del TAR al añadir dolutegravir (DTG) en el régimen de primera línea, siguiendo los protocolos del Plan Nacional del VIH/sida de RDC y la OMS<sup>114</sup>, apoyados por el Plan de Emergencia del

Presidente de los E.E.U.U. para el Alivio del sida (PEPFAR) y la Fundación Elizabeth Glaser Pediatric AIDS Foundation (EGPAF)<sup>115–117</sup>.

La OMS recomienda realizar un análisis de resistencias en la población infectada para controlar la prevalencia de virus resistentes en pacientes no expuestos (*naive*) y tratados<sup>118,119</sup>. Aunque normalmente hay un suministro regular del TAR en RDC según los clínicos colaboradores de este trabajo, los tratamientos esporádicos, la exposición interrumpida a fármacos y las altas tasas de pérdida de seguimiento pueden causar la aparición y expansión de MDR. Por ello, y para una mayor eficacia del tratamiento, es crucial documentar el perfil de MDR en virus que circulan en el país para mejorar el tratamiento de las personas que viven con VIH. Los datos actualizados de resistencia pueden ayudar a los clínicos a establecer el TAR de primera línea para pacientes *naive*, o guiar la optimización de la segunda línea de tratamiento en pacientes pretratados en fracaso virológico. Sin embargo, RDC carece actualmente de estudios sistemáticos de vigilancia para monitorizar la resistencia a ARV y para detectar cambios en la epidemiología molecular del VIH-1. Tampoco se realiza un seguimiento de CV generalizado, aunque se está implantando en algún hospital de referencia, como el de Monkole (Kinshasa).

El fracaso terapéutico se define como una respuesta inadecuada al TAR, ya sea clínica, inmunológica o virológica. Se sospechará fracaso terapéutico si, tras alcanzar la supresión viral la CV vuelve a ser detectable o, si una vez iniciado el TAR, se dan dos determinaciones consecutivas detectables. En caso de aparecer virus con MDR, el fracaso terapéutico se considerará virológico, que viene definido por una supresión viral incompleta o rebrote persistente de la CV o repetido después de haber conseguido una CV indetectable.

En niños, el TAR conlleva aumento de peso, disminución de infecciones bacterianas y oportunistas, disminución de ingresos hospitalarios, menor progresión a sida y mortalidad<sup>120,121</sup>. Por ello, muchos niños que nacen infectados llegan a la adolescencia y a la edad adulta con una adecuada situación inmunológica y virológica<sup>122–124</sup>. Sin embargo, hay menos fármacos aprobados para niños y el mal sabor y formulación de muchos de ellos dificultan su administración y adherencia<sup>125</sup>. El desarrollo de nuevos ARV en niños sufre retraso respecto a los de adultos. Además, los resultados de ensayos

clínicos en adultos no son extrapolables a niños, existiendo diferencias en tolerancia, ya que los pacientes pediátricos presentan farmacocinéticas diferentes que varían con la edad. En niños, la adherencia es más difícil de mantener y deben atravesar etapas críticas como la adolescencia. Por otro lado, dada la cronicidad del tratamiento en pacientes VIH-1 positivos, los niños infectados van a recibir a lo largo de su vida múltiples tratamientos debido a la aparición de efectos secundarios, toxicidad, resistencia virológica y falta de adherencia. Ello aumenta el riesgo de que sufran eventos de fracaso terapéutico virológico por la aparición de virus resistentes a los ARV<sup>119</sup>.

## **MONITORIZACIÓN DE LA INFECCIÓN POR VIH**

Hay una serie de parámetros a tener en cuenta que deben ser evaluados antes del TAR y a lo largo de toda la vida de las personas infectadas por VIH, para asegurar la mejor terapia y cuidado posible en cada caso. Los parámetros son los siguientes:

### **Monitorización de la carga viral**

La determinación de la CV plasmática es esencial para evaluar la respuesta al TAR, cuyo objetivo es suprimir la replicación viral y lograr valores indetectables de viremia en las primeras 24 semanas de inicio del tratamiento (<20-50 cp/ml, según las técnicas), con el fin de limitar la transmisión del virus. Por ello, la OMS recomienda la cuantificación de la viremia para reforzar la adherencia al TAR antes de la selección de resistencias en la población viral<sup>126-128</sup>. Se debe realizar una primera determinación de CV a las 2-4 semanas del inicio del tratamiento, posteriormente cada 3-6 meses o con más frecuencia si se sospecha deterioro clínico, inmunológico o virológico<sup>125,129</sup>. Sin embargo, la capacidad para implementar un test de CV de rutina es limitada en muchas zonas por el coste de las técnicas, falta de infraestructuras y dificultades en la toma, almacenamiento y transporte de muestras para cuantificar el virus<sup>72,130-132</sup>. Por estas limitaciones en muchos países con recursos o infraestructuras limitadas, como puede ser RDC, no se ha podido implementar aún la cuantificación de la CV en la rutina clínica a nivel nacional, por lo que no se conoce el porcentaje de personas con VIH en tratamiento con carga viral indetectable<sup>51</sup>.

### **Estudio de resistencias a fármacos antirretrovirales**

Debido a la estructura en cuasiespecie del virus y a la imposibilidad de una supresión completa de su replicación, tras el inicio del tratamiento el VIH puede seleccionar rápidamente variantes preexistentes portadoras de mutaciones que le confieran una reducción de susceptibilidad o incluso resistencia a uno o varios fármacos de su terapia, conduciendo al fracaso del TAR<sup>133</sup>. Las MDR se seleccionan si la supresión de la replicación viral por el TAR ha sido incompleta por mala adherencia, por una pauta inadecuada o por niveles insuficientes de fármacos en los regímenes<sup>125</sup>.

Se han descrito MDR para todos los ARV en uso terapéutico, que reducen la actividad farmacológica del ARV mediante distintos mecanismos, aunque no todas las mutaciones tienen la misma importancia. Existen MDR “primarias o principales”, que determinan resistencia farmacológica y suelen disminuir la capacidad replicativa (*fitness*) del virus. También pueden existir MDR secundarias en ciertas familias de fármacos (IP e INI), que contribuyen a la resistencia en menor medida, estando alguna de ellas presentes de manera natural en ciertas variantes del VIH-1<sup>125,134</sup>. Se han identificado las mutaciones más relevantes asociadas a resistencia para pacientes *naïve*<sup>135</sup>, conocidas como mutaciones de resistencia transmitidas (MRT), mientras que para aquellos pacientes en tratamiento se consideran mutaciones de resistencias adquiridas (MRA)<sup>136</sup>. Las MDR pueden quedar archivadas por meses o años en el ADN proviral del genoma de la célula hospedadora y emerger después al ser seleccionadas por el TAR<sup>137</sup>. Actualmente la monitorización de resistencias a nivel mundial es un tema prioritario para la OMS<sup>119</sup>.

La detección de virus resistentes a los fármacos puede realizarse por técnicas genotípicas o fenotípicas<sup>138</sup>. Los ensayos genotípicos detectan cambios específicos en la región genética viral que codifica las proteínas diana de los fármacos ARV (PR, RT, INT, proteínas de la envoltura, entre otras) y se usan en la rutina clínica al ser más rápidas y accesibles. También permiten caracterizar la variante del VIH. Las fenotípicas determinan la respuesta de la población viral mayoritaria a concentraciones crecientes de los distintos fármacos ARV. Ambas técnicas presentan dificultad para detectar variantes resistentes con frecuencias menores del 15-20% en la población viral (secuenciación de Sanger) o con viremia menor de 1.000 cp/ml. Actualmente existen métodos que detectan mutaciones en niveles de hasta 0,1-1%. (secuenciación masiva y

métodos de cuantificación viral ultrasensibles). Se recomienda realizar un estudio genotípico de resistencias del VIH-1 en todos los pacientes en el momento del diagnóstico de la infección, antes de iniciar el TAR y cuando se requiere cambiar el TAR por fracaso virológico confirmado. La no detección de mutaciones no descarta la presencia de virus resistentes que pueden ser seleccionados posteriormente<sup>125</sup>.

El TAR basado en ITINAN continúa utilizándose en regímenes de primera línea en África subsahariana, por lo que se espera un aumento en las MRT a ITINAN en más del 10% en esta región durante los próximos 15 años. Esta tasa de MRT será responsable del 16% de las muertes por sida y del 9% de las nuevas infecciones por el VIH en África subsahariana en 2016-2030<sup>139</sup>. Los individuos con MRT a ITINAN que inician un régimen basado en ITINAN tienen menos probabilidades de lograr la supresión de la carga viral, y es más probable que desarrollen fallo virológico y que interrumpan el tratamiento. Este patrón también se observa en niños tratados con infección por VIH<sup>140</sup>. Para las mujeres con VIH que inician el TAR durante el embarazo, la resistencia plantea un desafío importante para la eliminación de la transmisión del VIH de madre a hijo<sup>141</sup>. Esta situación es más común en países de ingresos bajos y medios, donde no hay un seguimiento de las MDR o exposición previa a determinados ARV. Además, la pérdida significativa de susceptibilidad de la familia de ITIAN es de particular preocupación en niños, para quienes el número de ITIAN con formulación infantil es limitado<sup>142</sup>. Los altos niveles de resistencia a los medicamentos adquiridos después del primer tratamiento reducen la susceptibilidad del virus a los ARV y ponen en peligro el reciclaje de los ARV en los TAR de segunda línea<sup>142</sup>.

### **Identificación de la variante viral infectante**

El seguimiento clínico de la enfermedad mediante la detección de resistencias o la estimación de la CV también se puede ver afectado por la variabilidad del virus, ya que ciertas variantes pueden cuantificarse incorrectamente o incluso no detectarse<sup>11,33,143-145</sup>. Además, la cuantificación de la CV de la misma muestra con distintas técnicas puede ser discordante<sup>34,82,144,146-149</sup>, como ocurre en otros virus ARN<sup>150</sup>. Por ello, es esencial una adecuada detección y descripción de las variantes del VIH-1 en cohortes. Es necesario caracterizar las secuencias genéticas virales mediante análisis filogenético. Todas las variantes del VIH-1 y VIH-2 poseen marcadores específicos de variantes a lo

largo del genoma que se han fijado durante la evolución viral, algunos de los cuales están en posiciones relacionadas con resistencia primaria o secundaria a ciertos ARV. Las implicaciones clínicas, biológicas y epidemiológicas de las variantes no-B del VIH-1 (subtipos diferentes del B y recombinantes entre subtipos) ya se han descrito en apartados anteriores de esta Introducción.

### **Linfocitos T CD4**

Durante la infección por el VIH se pierden progresivamente los linfocitos T CD4 en sangre periférica y tejidos linfoides<sup>151</sup>. El número de linfocitos T CD4 en sangre aumenta con el TAR<sup>152</sup> y por ello se debe vigilar para que se mantenga en unos niveles mínimos.

## **TRANSMISIÓN VERTICAL Y PROGRAMAS PTMH**

La transmisión vertical del VIH puede ocurrir durante la gestación, el parto o la lactancia<sup>153</sup>. La infección intraútero está mediada por microtransfusiones sanguíneas de la madre al feto a través de la placenta. Estas microtransfusiones se vuelven más frecuentes por las contracciones intrauterinas en el momento del parto, aumentando así las probabilidades de la transmisión del virus. Además, a través del canal del parto, el feto tiene contacto mucocutáneo con la sangre materna, el líquido amniótico y las secreciones cervicovaginales. En ausencia de intervenciones específicas, la tasa estimada de transmisión vertical es del 15-40%<sup>153</sup>. En general, el riesgo de transmisión es mayor en las gestantes con estadios clínicos e inmunológicos de enfermedad avanzada y en aquellas con CV elevada<sup>154,155</sup>. De hecho, la CV materna se considera como uno de los principales factores de riesgo de la transmisión vertical<sup>154,156,157</sup>. Por lo tanto, uno de los objetivos principales de los programas PTMH es reducir la CV mediante el TAR durante la gestación para reducir la transmisión del VIH<sup>156</sup>.

Durante los últimos años se ha ampliado el número de PTMH a nivel mundial, y se han recomendado visitas de asesoramiento clínico a niños expuestos desde las primeras semanas de vida hasta los 18 meses de edad<sup>158</sup>. Sin embargo, en África subsahariana, donde se concentra la mayor incidencia de la infección por VIH en adultos y niños, existen importantes barreras para el desarrollo de programas PTMH<sup>159,160</sup>. Estas barreras están relacionadas fundamentalmente con factores socio-económicos, con una escasa información para la prevención de la infección en la mujer en edad fértil, con la

falta y dificultad de acceso a una estructura sanitaria adecuada para su diagnóstico y tratamiento, con el estigma asociado a la infección y con una falta de programas de apoyo social y económico<sup>161</sup>. A pesar de ello, en los últimos años se ha extendido el TAR en estos países y en el colectivo de mujeres embarazadas, llegando a una cobertura de hasta el 95% en este y sur de África y del 58% en África central y occidental en 2019<sup>52</sup>.

En RDC, 68.000 niños (0-14 años) viven con VIH, principalmente debido a la alta tasa de transmisión materno-infantil (24,9%) (**Tabla I.4**). Se estima unos 7.700 niños se infectaron en 2019 y se evitaron 3.000 infecciones gracias a los programas PTMH<sup>51</sup>. Estos programas han mejorado la situación del país, ya que en 2010 solo el 6% de las mujeres embarazadas con VIH tenían acceso al TAR y en 2019 esta cobertura aumentó hasta un 45% (**Tabla I.4**), aunque solo el 35% de las mujeres embarazadas tenían acceso a pruebas de diagnóstico para VIH. Otro factor importante en estos programas es el diagnóstico precoz infantil, que también ha mejorado pero sigue en niveles muy bajos, desde 2,5% en 2010 hasta el 16% en 2019 (**Tabla I.4**)<sup>51,52</sup>. Aun así, queda mucho que hacer para conseguir erradicar esta transmisión materno-infantil, como ocurre en Europa o América del Norte.

**Tabla I.4. Evolución y situación de la eliminación de la transmisión materno-infantil**

	2010	2019
<b>Porcentaje de mujeres embarazadas que viven con VIH y tienen acceso al tratamiento antirretroviral</b>	6% [4-7%]	45% [33-58%]
<b>Tasa de transmisión vertical final (incluyendo lactancia)</b>	36% [34-39%]	24,9% [21-29%]
<b>Diagnóstico precoz infantil</b>	2,5% [1,9-3,3%]	16% [12,5-21,5%]

**Leyenda Tabla I.4.** Adaptada de UNAIDS data 2020<sup>52</sup>.

La implementación de programas PTMH reduce la cantidad de niños recién infectados. Sin embargo, la alta incidencia del VIH materno, las pruebas deficientes de VIH y el control de la viremia para mujeres embarazadas y posparto contribuyen sustancialmente a la exposición del VIH a los bebés durante el embarazo y la lactancia en entornos con una alta carga de VIH. Este es el caso de RDC, donde hay más de 320.000 niños no infectados pero expuestos al VIH<sup>51</sup>. Estos niños expuestos, presentan una tasa de mortalidad 3,9 y 2 veces mayor que los niños no expuestos al VIH durante el primer y segundo año de vida, respectivamente<sup>162</sup>. Es más probable que nazcan prematuros o tengan un retraso en el crecimiento<sup>162</sup>, así como mayor probabilidad de infecciones



debido a una mayor activación inmunitaria e inflamación<sup>162–164</sup> o desnutrición por las bajas tasas de lactancia<sup>165</sup>. Sin embargo, a pesar de la importancia para la salud pública de la enorme cantidad de niños expuestos involucrados en la epidemia, la supervisión dirigida a la población de niños expuestos al VIH es escasa en todo el mundo y se ha descuidado en gran medida<sup>166</sup>.

### IMPACTO DEL VIH EN EL SISTEMA INMUNE

La infección por VIH no solo se considera como una inmunodeficiencia inducida por virus en evolución, sino también como una enfermedad inflamatoria crónica. El VIH provoca:

- **Inmunodeficiencia adquirida**, producida por la destrucción de los linfocitos T CD4 del sistema inmune. Esto hace que los pacientes sean más vulnerables a otras infecciones y tipos de cáncer.
- **Inflamación crónica**. La inflamación es estimulada por la liberación de factores químicos y sirve para establecer una barrera física contra la propagación de la infección, y para promover la recuperación de algún tejido dañado siguiendo el aclaramiento de los patógenos. Pero cuando esta inflamación es crónica, produce una disfunción inmune que provoca la aparición prematura de enfermedades relacionadas con el envejecimiento y la deficiencia inmunológica, debido a un agotamiento de las células inmunes, daño en tejidos y permeabilidad de vasos sanguíneos.
- **Activación inmune**. Se caracteriza por la producción inapropiada de citosinas pro-inflamatorias y la sobreexpresión de marcadores de activación celular y de agotamiento. Esta activación aumenta la susceptibilidad de las células diana a la infección por VIH y la replicación del virus en las células ya infectadas, lo que acelera la progresión de la enfermedad. Además, conduce al agotamiento de las células T y la apoptosis de las células T CD4+ y CD8+.

Hay una serie de marcadores inmunes que son reguladores del sistema inmunológico y de las respuestas inmunitarias de las células T frente a los patógenos invasores<sup>167</sup> y

pueden alterarse durante la infección por VIH a pesar de estar bajo TAR o con carga viral indetectable<sup>168</sup>. Por ello, estos reguladores del sistema inmune pueden usarse como biomarcadores para monitorear la progresión de la enfermedad del VIH y la respuesta terapéutica en individuos infectados<sup>167</sup>, al igual que pueden hacerlo en otras enfermedades infecciosas persistentes y cáncer<sup>169,170</sup>. También pueden predecir el riesgo de comorbilidades asociadas con la inflamación crónica<sup>171</sup>. De hecho, se sabe que la infección por VIH aumenta los niveles plasmáticos de algunos biomarcadores inmunes solubles en comparación con los no infectados<sup>172-174</sup>, incluso en infectados por VIH tratados con TAR bien controlados con viremia suprimida<sup>168,174</sup>.

## MORTALIDAD Y VACUNACIÓN INFANTIL

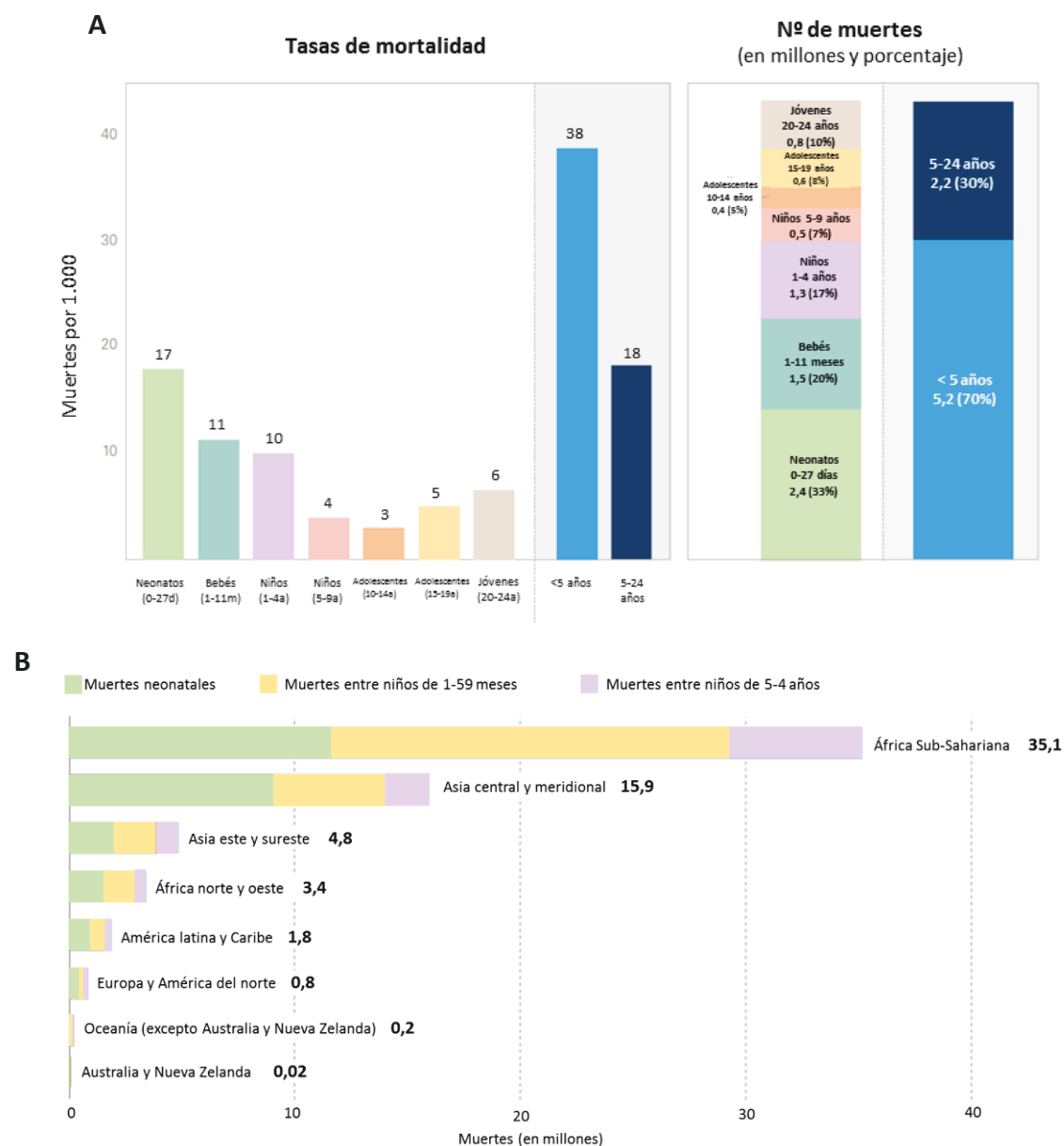
### Mortalidad infantil y sus causas

Se han hecho enormes progresos en la supervivencia infantil en las últimas dos décadas, pero aún hay enormes tasas de mortalidad infantil a nivel global, sobre todo en África subsahariana, Asia y América Latina, y en menores de 5 años. La tasa de mortalidad en niños, adolescentes y jóvenes de hasta 24 años por edad a nivel global y por región geográfica, se indica en la **Figura I.11**.

El número total de muertes entre niños y jóvenes adolescentes menores de 15 años disminuyó en casi un 60% desde 1990 hasta 2019. A pesar de este progreso, solo en 2019 7,4 millones de niños, adolescentes y jóvenes murieron principalmente por causas prevenibles o tratables. Casi la mitad (49%) de todas las muertes de menores de cinco años ocurren en cinco países: India, Nigeria, Pakistán, RDC y Etiopía. RDC, país de origen de los niños y adolescentes en estudio en esta Tesis, presenta una alta tasa de mortalidad en niños menores de 5 años, llegando a 85 por 1.000 nacimientos<sup>175</sup>. Más de la mitad (53,3%) de las muertes en menores de 5 años ocurren en África subsahariana. En 2019, la región tenía una tasa promedio de mortalidad de menores de 5 años de 76 muertes por cada 1.000 nacimientos<sup>175</sup>. Casi la mitad de las futuras muertes de recién nacidos se pueden prevenir con una cobertura alta de atención prenatal, atención especializada en el parto, atención posnatal para la madre y para el bebé y con el cuidado de estos recién nacidos enfermos<sup>176</sup>. La **Figura I.12** muestra la mortalidad en niños de 5 años según su causa, destacando como causa principal la neumonía que

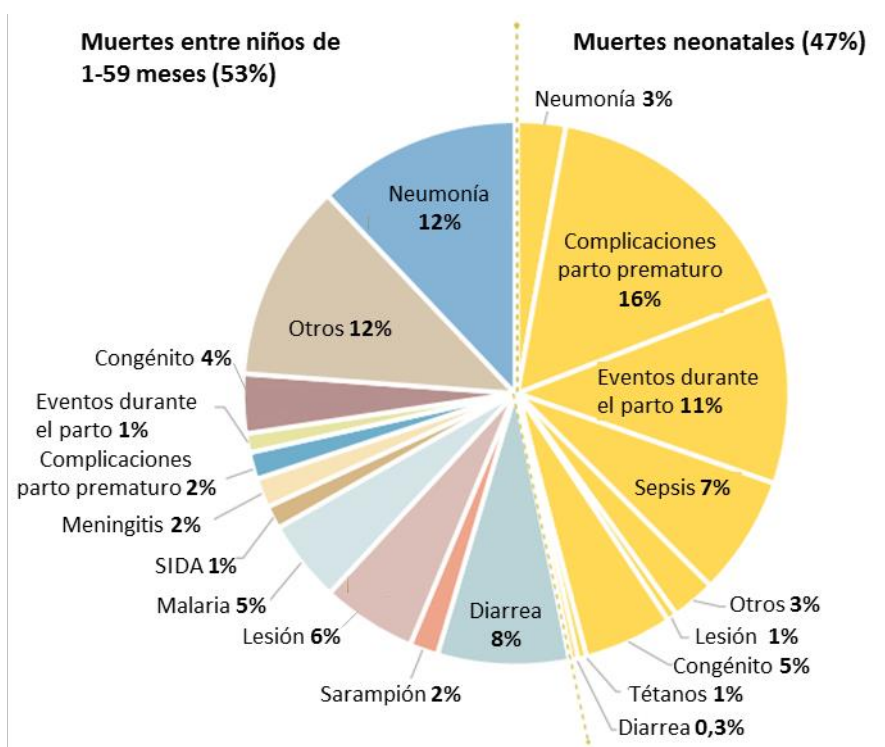
puede ser debida a enfermedades vacunables como la tosferina. En menor medida, aparecen otras infecciones prevenibles por vacunación como el sarampión o el tétanos y otras infecciones importantes como el VIH y la malaria<sup>177</sup>.

**Figura I.11. Tasas de mortalidad infantil y número de muertes a nivel global en 2019 (A) y número de muertes estimadas en menores de 5 años por regiones en 2019-2030 (B).**



**Leyenda Figura I.11.** Adaptadas de Trends and Levels in Child Mortality 2020 (A)<sup>176</sup> y 2019 (B)<sup>177</sup>.

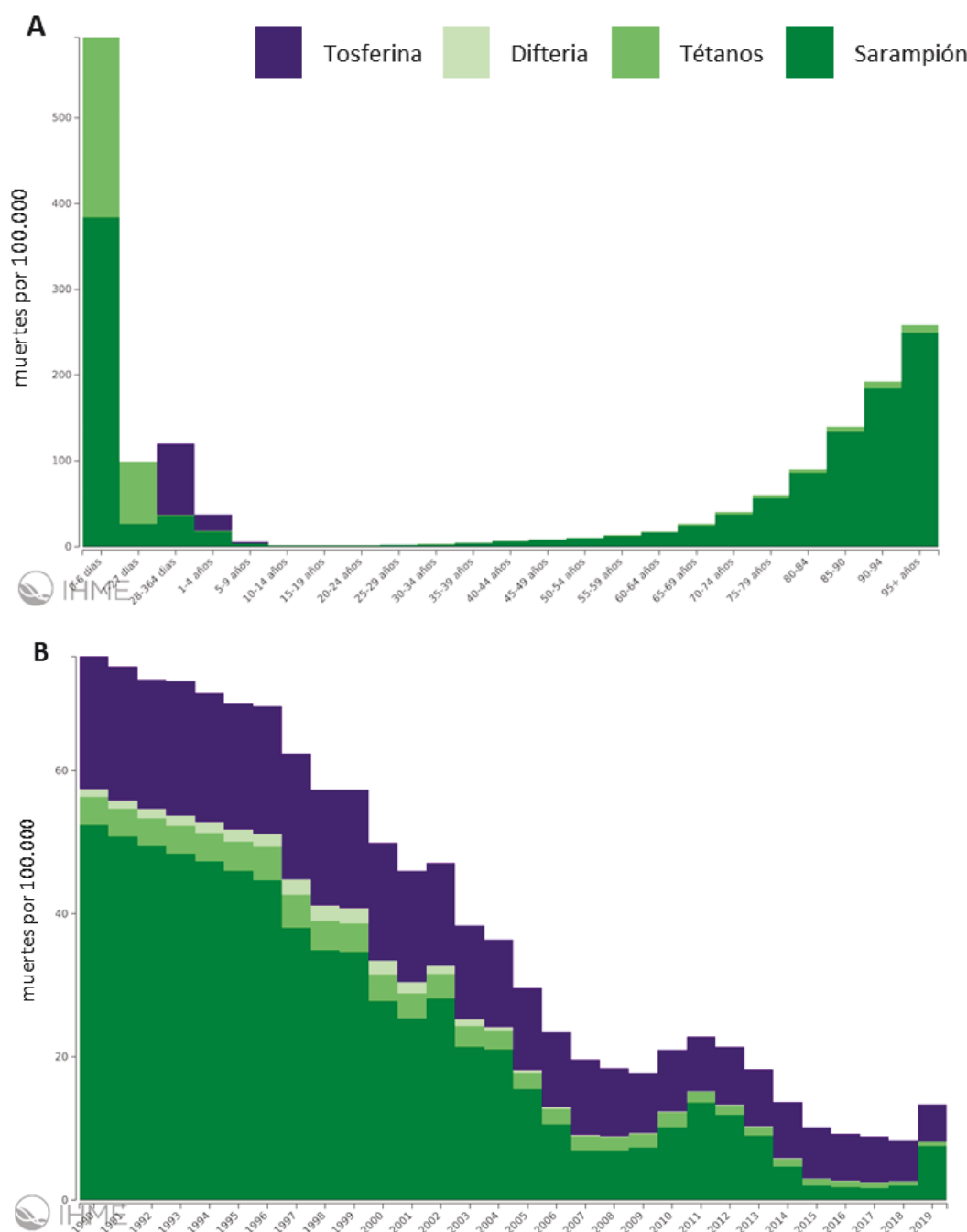
**Figura I.12. Distribución global de las muertes entre niños menores de 5 años por causa en 2018.**



**Leyenda Figura I.12.** Adaptada de Trends and Levels in Child Mortality 2019<sup>177</sup>.

En cuanto a la mortalidad infantil en RDC por enfermedades vacunables, la **Figura I.13** indica los datos más recientes de mortalidad (nº de muertes por 100.000 habitantes) frente a sarampión, tétanos, difteria y tosferina en 2019. De estas cuatro enfermedades con datos disponibles, se observa como el tétanos causa la mayoría de las muertes en recién nacidos, la mortalidad causada por tosferina se centra en los niños de entre 28 días y 4 años, mientras que la difteria causa una mortalidad muy inferior. El sarampión es la enfermedad infecciosa más mortal entre estas cuatro, sobre todo en menores de 4 años y en mayores de 60 años (**Fig. I.13A**). Si vemos la evolución temporal de la mortalidad por estas cuatro enfermedades en el país, podemos observar como las mejoras han sido muy significativas. La reducción más drástica se produjo en la mortalidad por sarampión, mostrando repuntes puntuales entre 2010-2013 y 2019. La mortalidad por difteria fue prácticamente nula, y la de tosferina y tétanos ha disminuido pero más paulatinamente (**Fig I.13B**)<sup>178</sup>.

**Figura I.13. Tasa de muertes por cada 100.000 personas por enfermedades vacunales en RDC según edad en 2019 (A) y número de muertes por años debidas a estas enfermedades (B).**



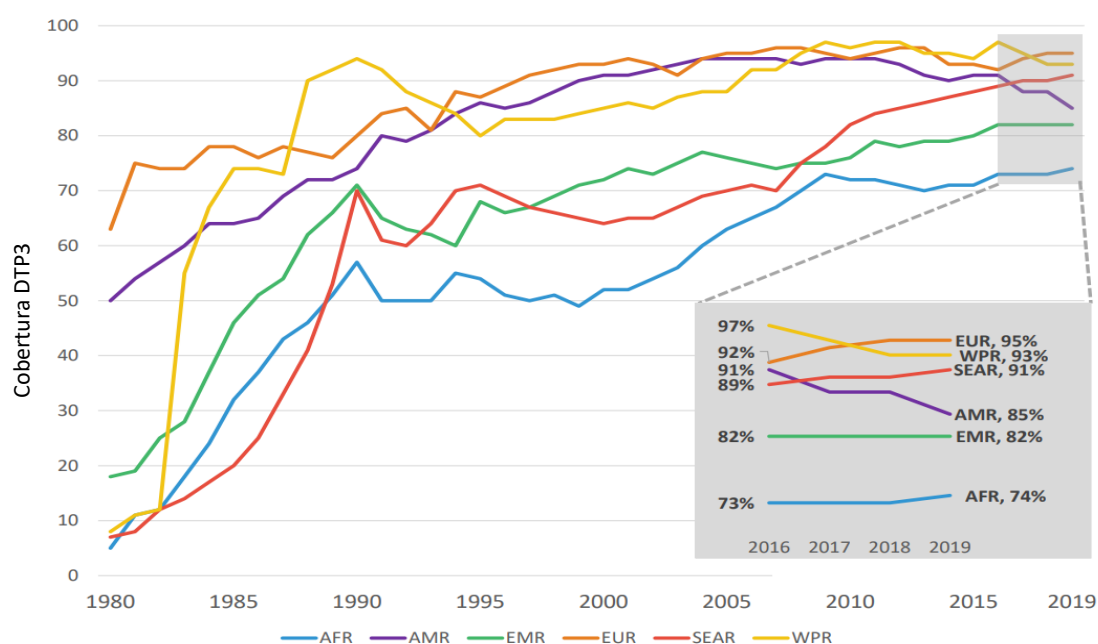
**Leyenda Figura 5.7.** Gráficas realizadas con la herramienta del Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME University of Washington)<sup>178</sup>.

### Vacunación infantil

Poner fin a las muertes de niños menores y adolescentes por enfermedades prevenibles es fundamental. El aumento en la cobertura mundial de vacunas ha reducido la enfermedad, la morbilidad y la muerte en los niños, aunque las coberturas

son muy distintas entre países (**Fig. I.14**). Según UNICEF, en 2019 entre 8 y 9 de cada 10 niños recibieron la tercera dosis de la vacuna frente a la difteria, tosferina y tétanos (DTP3), ampliamente utilizada como un indicador de la capacidad de un país para proporcionar servicios de inmunización. Aún así, hay casi 20 millones de niños que o no se han vacunado o no recibieron una vacunación completa en 2019<sup>179</sup>.

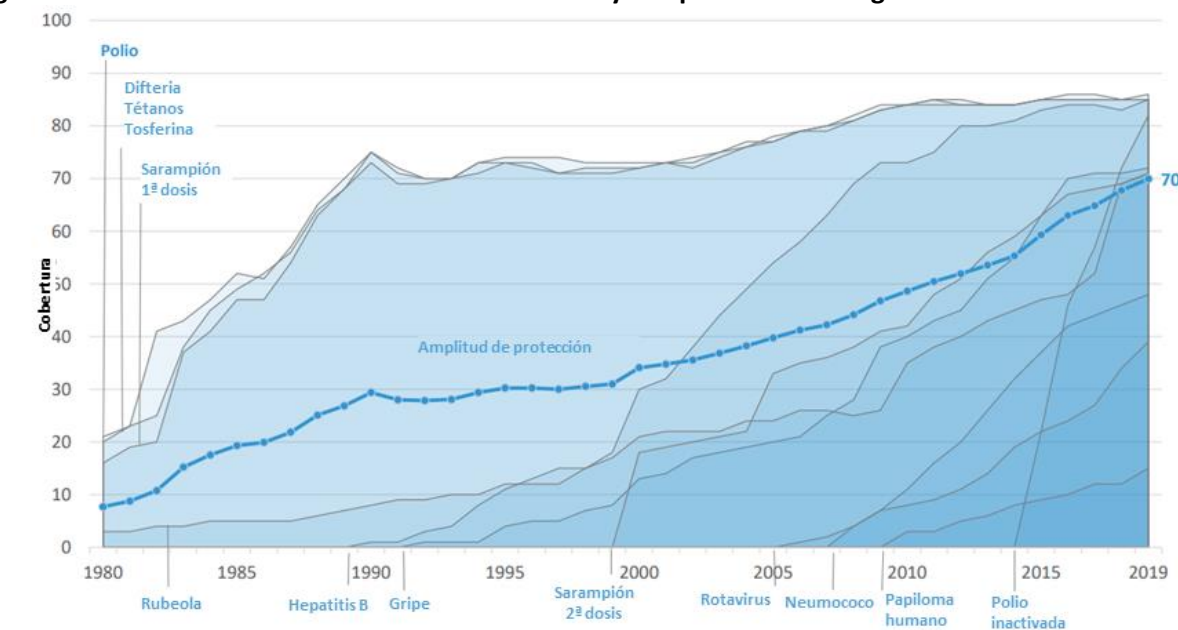
**Figura I.14. Diferencias de cobertura vacunal entre regiones geográficas.**



**Legenda Figura I.14.** AFR, Región Africana; EMR, Región del Mediterráneo Oriental; AMR, Región Americana; SEAR, Región de Asia Sudoriental; WPR, Región del Pacífico Occidental; EUR, Región Europea. Figura adaptada de Progress and Challenges with Achieving Universal Immunization Coverage<sup>179</sup>.

En la **Figura I.15** podemos ver cómo se han ido incorporando al calendario vacunal, 11 vacunas frente a 12 patógenos y cómo ha evolucionado la cobertura de cada una de ellas. En 1980 había una cobertura del 9% y en 2019 es del 70%, proporcionando una protección cada vez mayor para los niños<sup>179</sup>.

**Figura I.15. Evolución de la cobertura de 11 vacunas y su aparición a nivel global.**



**Leyenda Figura I.15.** Figura adaptada de Progress and Challenges with Achieving Universal Immunization Coverage<sup>179</sup>.

Según datos de la OMS de 2019 para RDC, la cobertura de la tercera dosis de DTP fue del 57%, al igual que la cobertura de la primera dosis de la vacuna contra el sarampión, aunque no hay datos disponibles de la segunda dosis de la vacuna contra el sarampión<sup>180</sup>. Por ello, las enfermedades prevenibles por vacunación, como el sarampión o el tétanos, siguen causando brotes periódicos cada 2-3 años, con miles de muertes infantiles debido a la baja cobertura de vacunación. Así, en 2019, se notificaron en RDC 6.045 muertes por sarampión, principalmente entre niños menores de 5 años y el brote hoy en día sigue activo<sup>181</sup>. En la **Figura I.16** se muestra el calendario vacunal de RDC, según los clínicos de Kinshasa y las guías oficiales del país<sup>182</sup>. Debemos destacar que hubo una discrepancia entre el calendario vacunal proporcionado por la OMS<sup>180</sup>, donde se recomienda una única dosis de vacuna contra el sarampión a los 9 meses de edad, y el oficial de RDC, donde no consta la administración de esta vacuna.

**Figura I.16. Calendario vacunal infantil de RDC**

**Leyenda Figura I.16.** VPO, vacuna antipoliomielítica oral; VPI, vacuna antipoliomielítica inactivada; BCG, vacuna frente al Bacilo Calmette-Guérin (tuberculosis); DTP, vacuna frente a la difteria, el tétanos y la tosferina; HepB, vacuna frente a hepatitis B; Hib, vacuna anti-*Haemophilus influenzae* tipo b (meningitis); Rota, vacuna frente rotavirus; Pneumo, vacuna antineumocócica, *Streptococcus pneumoniae* (neumonía); VAR, vacuna frente a rubeola; VAA, vacuna frente a la fiebre amarilla. También se incluyen 5 dosis de vacuna antitetánica materna. Calendario vacunal del Ministerio de Sanidad de RDC<sup>182</sup> y de la cartilla de vacunación actual.

### Vacunación en niños con VIH

Los niños infectados con VIH, aun con buen control inmunológico, presentan un mayor riesgo de padecer enfermedades infecciosas inmunoprevenibles, por lo que debe optimizarse al máximo el calendario vacunal<sup>183,184</sup>. La mayoría de los niños infectados por VIH mediante transmisión vertical tienen una capacidad de respuesta inmune humoral y celular relativamente conservada durante los 2 primeros años de vida. Además, muestran unas tasas de seroconversión aceptables, aunque los niveles de anticuerpos inducidos por casi todas las vacunas sean menores y caigan más rápidamente que en la población general<sup>184–187</sup>, sobre todo si la enfermedad progresa y la inmunodeficiencia se agrava. Por ello, la vacunación debe llevarse a cabo lo más precozmente posible, antes de que el deterioro del sistema inmune, producido por la infección, comprometa seriamente la inmunogenicidad de las vacunas. Esto es particularmente importante en los países de bajo nivel económico en los que, debido a la carencia de TAR adecuados, la destrucción inmune ocurre en menor tiempo. Los niños con VIH muestran unas tasas de seroconversión aceptables, aunque los niveles de anticuerpos inducidos por casi todas las vacunas sean menores y caigan más rápidamente que en la población general, sobre todo si la enfermedad progresa por la ausencia o TAR ineficaz, y la inmunodeficiencia se agrava. Se sabe que la proporción de niños que alcanzan títulos protectores es variable, dependiendo del tipo de vacunas, de la recuperación inmune y de la supresión de la actividad viral. En general, porcentajes



más altos de linfocitos CD4 y una carga viral baja se asocian con mejores respuestas a las vacunas, aunque ni siquiera estos datos son consistentes en todos los estudios<sup>184</sup>. Estudios previos sugieren que la revacunación después de iniciar el TAR puede ser útil para aumentar la protección en algunos niños<sup>183,188</sup>, la cual muchos de ellos alcanzarán, pero una proporción significativa perderá en los años siguientes. La media del título de anticuerpos es menor en niños VIH infectados que en los niños sanos y, además, desciende hasta desaparecer a los pocos años<sup>184</sup>.

En niños con infección por el VIH, especialmente con inmunodeficiencia grave, no se recomienda la administración de vacunas bacterianas o virales vivas atenuadas, como la de la tuberculosis (BCG), fiebre tifoidea oral, virus de la poliomielitis oral o la fiebre amarilla con la excepción de por ejemplo, sarampión, paperas, rubéola y varicela. Algunas de ellas como la BCG pueden desencadenar la enfermedad local o diseminada<sup>184,186,189</sup>.

# Objetivos

Los objetivos de esta Tesis fueron:

1. Comparar la eficacia de dos técnicas POC para el diagnóstico precoz y la cuantificación de la CV (Cepheid Xpert HIV-1 Qual y Xpert HIV-1 VL) con la prueba cuantitativa no-POC Roche CAP/CTM Quantitative VL test v2.0 en sangre seca (DBS) de niños y adultos en Kinshasa (RDC), evaluando el impacto de la gran diversidad de variantes del VIH-1 que allí circulan.
2. Describir las variantes circulantes del VIH-1 en una población de niños, adolescentes y adultos de Kinshasa, epicentro de la epidemia de VIH-1 en el mundo y estudiar la evolución de la epidemiología molecular del VIH-1 en RDC a lo largo del tiempo (1976-2018).
3. Analizar las MDR en DBS y la sensibilidad a los ARV, para detectar fallos terapéuticos y evaluar las opciones de TAR en una población pediátrica infectada por VIH de Kinshasa.
4. Analizar la influencia de la infección por VIH y la exposición al VIH en el estado inmunitario de tres grupos de niños (VIH infectados, expuestos y no expuestos al VIH) midiendo 10 biomarcadores inmunes en DBS.
5. Estudiar la protección inmune a 6 patógenos que causan enfermedades prevenibles por vacunación en niños/adolescentes infectados y no infectados por VIH, estableciendo los valores de corte que proporcionan una sensibilidad y/o especificidad óptima en DBS.

# Materiales y Métodos

## POBLACIÓN DE ESTUDIO

Para el desarrollo del trabajo expuesto en esta Tesis se emplearon muestras de sangre seca o *dried blood spots* (DBS) de 163 niños (0-14 años) y adolescentes (15-21 años) en seguimiento clínico en las unidades pediátricas de los Hospitales Monkole<sup>190</sup> y Kalembelembe<sup>191</sup> en Kinshasa, RDC, que atienden a una población de 300.000 y 94.635 habitantes, respectivamente. La selección de los pacientes fue liderada por el Dr. Adolphe Ndarabu, jefe de Unidad de Enfermedades Infecciosas Crónicas y Banco de Sangre del Hospital de Monkole. Todas las muestras se recogieron en los hospitales congoleños por personal local entre 2016 y 2018.

Para los trabajos expuestos en los **Capítulos 1 y 2** también se incluyeron muestras de 269 adultos (>22 años) seguidos en las unidades de adulto del Hospital de Monkole recogidas en el mismo periodo de tiempo. Las muestras de adultos se analizaron en la Clínica Universidad de Navarra por el grupo del Dr. Gabriel Reina. Para el **Capítulo 5**, se utilizaron muestras de plasma pareadas con DBS de 42 niños de la cohorte, que procesamos en nuestro laboratorio en Madrid.

Entre los 163 pacientes pediátricos, 71 (43,6%) estaban infectados con VIH, 36 (22,1%) eran niños expuestos nacidos de madres con VIH y 56 (34,3%) eran niños sanos y no expuestos. Para cada objetivo de esta Tesis se utilizaron unas muestras determinadas del total disponible (**Tabla II.1**), que se describirán en cada capítulo correspondiente.

**Tabla II.1. Distribución de las muestras de Kinshasa utilizadas en esta Tesis.**

		Niños			Adultos		Total muestras usadas
		VIH+	Expuestos	VIH-	VIH+	VIH-	
<b>Capítulo 1</b>	<b>Técnicas POC</b>	14	7	64	70	5	160 DBS
<b>Capítulo 2</b>	<b>Variantes del VIH</b>	71 (55 sec.)	0	0	269 (110 sec.)	0	340 DBS
<b>Capítulo 3</b>	<b>Resistencias a ARV</b>	55 (27 niños/28 adolescentes)	0	0	0	0	55 DBS
<b>Capítulo 4</b>	<b>Marcadores inmunes</b>	10	10	10	0	0	30 DBS
<b>Capítulo 5</b>	<b>Marcadores vacunales</b>	52	35	56	0	0	143 DBS y 42 plasmas
<b>Total de muestras disponibles</b>		71	36	56	269	90	522*

**Leyenda Tabla II.1.** VIH+, paciente con infección por VIH; VIH-, paciente sin infección por VIH; DBS, sangre seca o *dried blood spots*; sec., secuencias *pol* del VIH generadas de los pacientes analizados de los que se consiguió PCR+ (1 sec. por paciente). \*número de muestras total disponibles en la cohorte.

### PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE SECA Y PLASMA

Para preparar las tarjetas de DBS en cada uno de los círculos o *dots* de una tarjeta Whatman 903 Protein Saver Card (Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania) se utilizaron 70 µl de sangre venosa recogida por venopunción en tubos con EDTA, como anticoagulante, preparando dos o tres tarjetas de DBS por paciente. Los DBS se dejaron secar durante una noche a temperatura ambiente y se guardaron en una bolsa de plástico junto con un desecante. Después se almacenaron a -20°C hasta su transporte en hielo seco desde Kinshasa hasta los laboratorios de Madrid y Pamplona, donde se guardaron a -80°C hasta el procesamiento de muestras pediátricas y de adultos, respectivamente. Todas las muestras vinieron asociadas a una hoja de información clínica donde se recogían distintas variables clínicas y epidemiológicas de cada paciente (**Figura Suplementaria I.1 - Anexo I**).

De algunos pacientes de la cohorte, junto con los DBS recibimos también muestras de plasma tomadas a partir de la misma muestra de sangre con la que se prepararon los DBS. Estos plasmas se prepararon en ambos hospitales de RDC tras centrifugar, durante 6 min a 30.000 rpm, sangre tomada en un tubo con EDTA.

### DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO Y MOLECULAR DEL VIH Y CUANTIFICACIÓN DE LA VIREMIA

El diagnóstico del VIH se realizó en primer lugar en Kinshasa, RDC mediante 3 pruebas serológicas rápidas: Determine™ HIV-1/2 Ag/Ab (Alere), Double-Check Gold HIV 1 & 2 (Organics) y Uni-Gold HIV (Trinity Biotech) en pacientes mayores de 18 meses de edad y por Biomerieux 4th generation immunoassay VIDAS® HIV Duo Ultra, o excepcionalmente por la prueba molecular Abbott real-time HIV-1 Qualitative, en lactantes menores de 18 meses.

En el Laboratorio de Epidemiología Molecular del VIH (Madrid), se confirmó el estado serológico del VIH en los niños con el ensayo confirmatorio BioRad Geenius™ HIV-1/2

utilizando la sangre seca eluída de un círculo de la tarjeta de DBS por paciente, como se publicó por el grupo anteriormente<sup>97</sup>. La técnica BioRad Geenius™ HIV-1/2 es un test útil para la detección de antígenos contra el VIH-1 y VIH-2. Contiene una fase sólida cromatográfica con la proteína A de enlace a anticuerpos, que se une de forma específica a los mismos. A su vez, esta proteína se encuentra conjugada a una partícula de oro coloidal. De ese modo, si existen antígenos en la muestra y se unen a ella, serán inmovilizados y se producirán unas líneas de color púrpura, demostrando su presencia.

El resultado de la técnica serológica Geenius se confirmó posteriormente en todos los pacientes pediátricos seropositivos e indeterminados empleando la técnica molecular POC Cepheid Xpert Qual (Xpert-Qual) a partir de un círculo de sangre seca eluido en el tampón de lisis proporcionado por la técnica tras agitar a 500 rpm durante 15 min a 56°C. Esta técnica está basada en la amplificación de ácidos nucleicos virales (ARN viral, ADN proviral) empleando PCR a tiempo real (RT-PCR) y ha sido aprobada para el diagnóstico del VIH empleando DBS y sangre completa<sup>192</sup>, proporcionando un resultado binario "detectado/no detectado"<sup>193</sup>. En la Clínica Universidad de Navarra, el estado serológico del VIH se confirmó en todos los adultos mediante dos inmunoensayos de cuarta generación no-POC: Elecsys® HIV combi PT (Roche) y VIDAS® HIV Duo Quick (bioMérieux), siguiendo las indicaciones de los fabricantes.

La CV del VIH-1 se cuantificó utilizando Cepheid Xpert HIV-1 VL (Xpert-CV)<sup>194</sup> y COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test v2.0 (Roche-CV)<sup>195</sup> en todos los pacientes VIH positivos. Ambas técnicas están basadas en la amplificación en tiempo real del genoma del VIH y se realizaron empleando un círculo del DBS eluido en tampón de lisis de Xpert-Qual en Xpert-CV o el tampón de lisis Roche SPEX para Roche-CV.

GeneXpert® es una plataforma automatizada que integra la preparación de muestras, la extracción y amplificación de ácidos nucleicos del VIH-1 (ARN viral y ADN proviral) y la detección de la secuencia diana en muestras utilizando RT-PCR. Este sistema se realiza mediante cartuchos desechables de un solo uso que contienen todos los reactivos necesarios y alojan los procesos RT-PCR.

Las características principales de los tres ensayos moleculares del VIH utilizados para detectar o cuantificar el VIH-1 en esta Tesis se describen en la **Tabla II.2**.

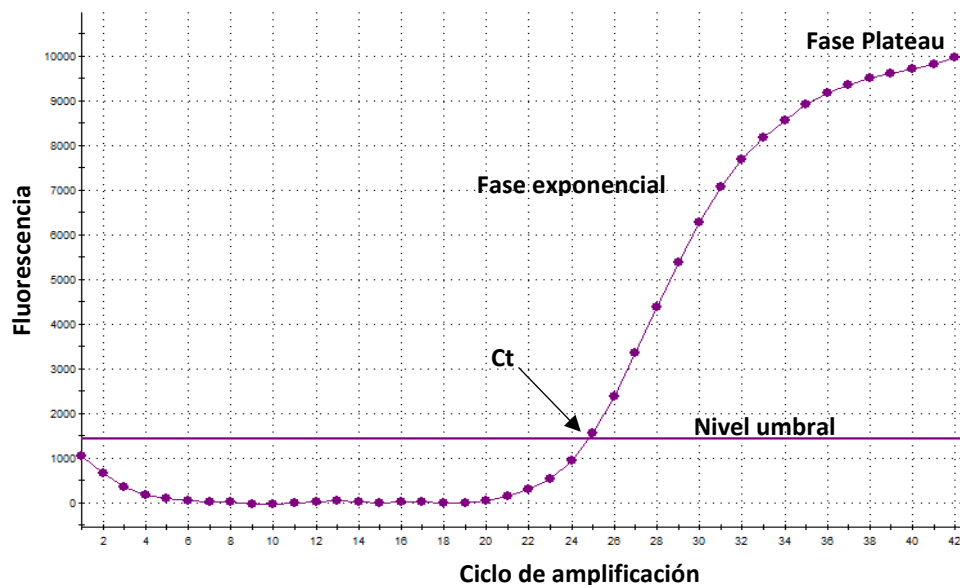
**Tabla II.2. Características de los ensayos moleculares para diagnóstico del VIH-1 y la cuantificación de la carga viral.**

Ensayos cualitativos (diagnóstico de VIH-1)		Ensayos cuantitativos (cuantificación de la carga viral del VIH-1)	
	Xpert-Qual	Roche-CV	Xpert-CV
Compañía	Cepheid	Roche	Cepheid
POC	Sí	No	Sí
Dianas virales	3'end-5'UTR	Gag + LTR	3'end-5'UTR
Muestra (según ficha técnica)	Sangre completa (100 µl) DBS (1 círculo)	Plasma	Plasma (1 ml)
LD	203 cp/ml (VQA, sangre completa) 278 cp/ml (OMS, sangre completa) 531cp/ml (VQA en DBS) 668 cp/ml (OMS en DBS)	20 cp/ml (plasma)	15.3 cp/ml (VCA en plasma) 18.3 cp/ml (OMS en plasma)
LQ	-	20 cp/ml (plasma) 20 cp/círculo (DBS)*	40 cp/ml (plasma) 40 cp/círculo (DBS)
Aprobado para diagnóstico en plasma	No	No	No
Aprobado para diagnóstico en DBS o sangre completa	Sí	No	No
Aprobado para CV en plasma	-	Sí	Sí
Aprobado para CV en DBS	-	No	No
Grupos del VIH-1 detectados	M, N y O	M y O	M, N y O

**Leyenda Tabla II.2.** CV, carga viral; POC, *point of care*; LD/Q, límite de detección/cuantificación; DBS, *Dried blood spots* o sangre seca; cp/ml plasma, copias de ARN de VIH por mililitro de plasma; LTR, *long terminal repeats* o repeticiones largas terminales; UTR, *untranslated region* o region no traducida en el LTR viral; Roche-CV, COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test v2.0; Xpert Qual, Cepheid Xpert HIV-1 Qual; Xpert-CV, Cepheid Xpert HIV-1 VL; VQA: *HIV-1 subtype B from viral quality assurance laboratory* o virus de subtipo B empleado para ensayos de calidad de laboratorio; OMS: virus del subtipo B del VIH-1 empleado por la OMS como 3<sup>rd</sup> International Standard NIBSC code 10/152. Datos de acuerdo a fichas técnicas. Xpert HIV-1 VL<sup>194</sup> y Xpert HIV-1 Qual<sup>193</sup>. \*, datos reportados por este estudio.

Para el análisis estadístico de los datos de CV del **Capítulo 1**, los valores de viremia informados por el sistema como <40 cp/ml (Xpert-CV) o <20 cp/ml (Roche-CV), que corresponden al límite inferior de detección de cada ensayo, se informaron como 39 cp/ml o 19 cp/ml, respectivamente, considerándolos como detectados, pero no como cuantificables. Definimos que el paciente en TAR estaba en fracaso terapéutico cuando su viremia era de 1.000 cp/ml o más, que es el umbral de fracaso del tratamiento clínico usando DBS definido por la OMS<sup>68</sup>. Como ambas técnicas de cuantificación de CV del VIH-1 se basan en RT-PCR en tiempo real, proporcionan un ciclo específico o Ct (*cycle threshold*), el cual se correlaciona inversamente con la concentración inicial del genoma viral o CV en la muestra infectada. Es decir, menores Ct en la detección se correlacionan con mayores viremias de la muestra infectada (**Fig. II.1**).



**Figura II.1. Curva de amplificación de una RT-qPCR y sus elementos**

En esta Tesis cuantificamos las copias de ARN del VIH-1 o CV que había por círculo de DBS (cp/círculo), que correspondería principalmente al virus circulante en el plasma que hay en los 70  $\mu$ l de sangre total que se pusieron en cada círculo de DBS. Para pasar de cp/círculo a cp/ml de plasma, tenemos que conocer el hematocrito o fracción celular de la sangre el paciente, que era desconocido en nuestros pacientes de estudio. Por ello, empleamos valores publicados previamente para poblaciones similares, asumiendo un hematocrito del 39% para niños, del 42% para mujeres y del 47% para hombres, según describen estudios previos<sup>196,197</sup>. Considerando esos valores de hematocrito, la CV en un círculo del DBS correspondería a la cantidad de copias de ARN del VIH-1 existente en los volúmenes reales de plasma tras descartar el hematocrito, que sería de 42,7  $\mu$ l, 40,6  $\mu$ l y 37,1  $\mu$ l por círculo según sean niños, mujeres u hombres, respectivamente. Así, una CV de 40 cp/círculo del DBS (mínima CV cuantificable por Xpert-VL) sería equivalente a entre 936-1078 cp/ml y una viremia de 20 cp/círculo (mínima CV cuantificable por Roche-CV) correspondería a aproximadamente 468-539 cp/ml plasma tras corregir por hematocrito de niños, mujer u hombre.

### EXTRACCIÓN DE ARN, AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN

Para realizar los estudios de resistencias y de caracterización de la variante viral en cada paciente de estudio, se requería extraer y amplificar por PCR al genoma del virus.

Para extraer los ácidos nucleicos totales de 2-3 círculos del DBS se empleó la plataforma automatizada NucliSENS easyMAG (BioMerieux) o el kit manual High-Pure Viral Nucleic Acid (Roche). La región *pol* de ARN viral codificante de las proteínas virales PR, RT e IN se amplificó mediante RT-PCR y PCR anidada o *nested* utilizando cebadores diseñados por la OMS<sup>91</sup> para la PR y RT, como se describió anteriormente<sup>100</sup>, o por la Agencia Francesa para la Investigación del sida y hepatitis virales (ANRS) para el caso de la IN<sup>198</sup>. Las secuencias virales incluyeron la PR completa del VIH-1 (codones 1–99), la RT parcial (codones 1–335/440) y la IN (codones 1–285). La ubicación de los cebadores se muestra en la **Figura Suplementaria I.2** del **Anexo I**. Los amplicones de la PCR se purificaron usando Illustra™ ExoProStar 1-Step™ (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Reino Unido) y secuenciados por MacroGen Inc. (Gasan-dong, Geumchun-gu, Seúl, Corea). Las secuencias fueron ensambladas y editadas manualmente usando el *software* Lasergene.

Las secuencias de adultos empleadas para la caracterización de variantes fueron generadas por el grupo del Dr. Gabriel Reina, del Servicio de Microbiología de la Clínica Universidad de Navarra, mientras que las secuencias de niños fueron parte experimental de esta Tesis Doctoral.

### CARACTERIZACIÓN DE LA VARIANTE DEL VIH-1

Las variantes del VIH-1 se caracterizaron por análisis filogenético (*phy*) de las secuencias virales una vez editadas con dos metodologías diferentes. Para el **Capítulo 1** de esta Tesis el *phy* se realizó utilizando el *software* MEGA6 con el modelo de sustitución nucleotídica Tamura-3-parámetros y un re-muestreo tipo *bootstrap* con 1.000 repeticiones. Se consideraron agrupamientos de secuencias fiables aquellos que presentaban un valor de *bootstrap* mayor de 700 sobre 1000 (70%). La topología del árbol se obtuvo mediante el método de distancia *Neighbour Joining*. Como referencias se tomaron, al menos, 2 secuencias representativas de cada grupo de VIH-1 no M (O, P y N) y de cada variante del grupo M (9 subtipos, 8 sub-subtipos y 83 CRF disponibles entre los 98 descritos en el momento del análisis)<sup>19</sup>. Las secuencias no identificadas

dentro de las variantes del grupo M o entre los CRF por *phy* se consideraron formas recombinantes únicas del grupo M del VIH-1 (URF) en *pol* (URF *pol*).

En el resto de capítulos, se hizo un análisis más exhaustivo con la colaboración del personal bioinformático del Laboratorio de Virología del Servicio de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal liderado por el Dr. Juan Carlos Galán. Las secuencias de *nt*s se tradujeron y alinearon usando el algoritmo ClustalW implementado en el *software* MEGA6. Para la caracterización de las variantes de VIH-1, utilizamos secuencias disponibles en la base de datos de Los Alamos (LANL: <http://www.hiv.lanl.gov>), anotadas por país de origen y fecha de toma de muestra. Se incluyeron como secuencias de referencia todas las variantes de VIH-1 descritas hasta la fecha del estudio con secuencia disponible. Se usó una secuencia del grupo N del VIH-1 como grupo externo. Las secuencias de los grupos P/O/N también se descargaron para descartar infecciones de estas variantes.

Para reducir el tiempo de análisis requerido al reconstruir algoritmos rápidos de grandes filogenias, los árboles filogenéticos (PhyMLtree) se reconstruyeron mediante el método de máxima verosimilitud (ML) con RAxML v8.0 (Randomized Axelerated Maximum Likelihood)<sup>199</sup> usando el modelo evolutivo general de tiempo reversible más la proporción de sitios invariables más el parámetro de distribución gamma (GTR+I+G). Para estimar los valores de *bootstrap* en la topología inferida por RAxML, se utilizó la prueba Shimodaira-Hasegawa (SH) utilizando el programa FastTree (soporte >90%)<sup>200</sup>.

Las secuencias que no se agrupaban con ninguna variante se analizaron utilizando el programa de detección de recombinación (RDP3v4.13)<sup>201</sup>, identificando los subtipos involucrados en eventos de recombinación y puntos de corte de recombinación hipotéticos. Para confirmar aún más los supuestos eventos de recombinación detectados, se realizaron nuevos análisis filogenéticos utilizando los fragmentos de secuencia asignados a diferentes subtipos según las posiciones de punto de corte propuestas por RDP3. Las topologías obtenidas con cada fragmento se compararon con SH, el peso de probabilidad esperado y las pruebas de Kishino-Hasegawa utilizando el programa TREE-PUZZLE 5.2. En los casos positivos, las secuencias recombinantes se redefinieron como URF. Las secuencias con un ancestro común más reciente a los subtipos A1-A6 o F1-F2 se identificaron como subtipos A o F, respectivamente. Los casos

restantes fueron designados como no clasificables (U). Como no fue posible secuenciar el mismo fragmento para todas las secuencias, se analizaron diferentes regiones por separado.

### DESCARGA DE SECUENCIAS DE LA BASE DE DATOS DE VIH DE LOS ÁLAMOS

En LANL se recopilan todas las secuencias genéticas del VIH-1 y VIH-2, dándoles un número de acceso para su identificación y posibilidad de descarga. Para nuestro estudio descargamos de LANL todas las secuencias existentes en formato fasta pertenecientes a cada una de las variantes del VIH-1. De esta manera recopilamos secuencias pertenecientes a cada uno de los 4 grupos (M, O, N y P), 10 subtipos del grupo M (A, B, C, D, F, G, H, J, K y L), sub-subtipos de los subtipos A y F y de los 99 CRF del grupo M del VIH-1 disponibles a fecha de estudio.

### IDENTIFICACIÓN DE REDES DE TRANSMISIÓN

En el **Capítulo 2**, se identificaron redes de transmisión entre las 165 secuencias disponibles en nuestra cohorte de Kinshasa (2016-2018). Estos grupos de transmisión se definieron como aquellas secuencias que pertenecían al mismo subtipo/CRF/URF, agrupadas en un grupo único (clado monofilético) y con buen soporte estadístico que tuviera un valor máximo (100%) de *bootstrap*. En las muestras que se pudieron solo rescatar secuencias parciales de *pol*, cada fragmento presente en todas las secuencias de un mismo grupo se analizó por separado. De esta forma, se detectaron nuevos eventos de recombinación. Las secuencias con diferentes eventos de recombinación, pero con un fragmento recombinante compartido y el mismo virus progenitor se consideraron redes de transmisión.

### ANÁLISIS DE DIVERSIDAD GENÉTICA

En el **Capítulo 2** también se analizó la evolución de la diversidad genética ( $D = 1 - \sum f^2$ ) de las variantes del VIH-1 en RDC en el tiempo. La diversidad genética es una medida de

variabilidad que tiene en cuenta las frecuencias (f) de todas las variantes en la población de estudio. Para ello, se descargaron y reclasificaron las 2.802 secuencias de *pol* disponibles en LANL de RDC, como se describió anteriormente. Entre ellos, 2.588 (92,3%) tenían información del año de muestreo, comprendido entre 1976 a 2012. También se calculó la diversidad genética viral entre niños y adultos infectados por el VIH con las muestras recolectadas en Kinshasa entre 2016 y 2018. Analizamos la distancia genética (número de sustituciones de bases por sitio) o la divergencia evolutiva promedio sobre todos los pares de secuencias utilizando el modelo de Tamura-Nei 93 (TN93)<sup>202</sup>, según estudios anteriores<sup>203</sup>. La tasa de variación entre sitios se modeló con una distribución *gamma* y el análisis se realizó con el *software* MEGA6. Definimos un grupo de transmisión reciente como aquel que muestra una distancia genética máxima por pares inferior a 0,01, según informes anteriores<sup>203,204</sup>. Se usó TN93 porque es el modelo de sustitución de nt más general para el cual las distancias se pueden estimar directamente a partir de recuentos de pares de nt en secuencias alineadas.

## ANÁLISIS DE MUTACIONES DE RESISTENCIA A ANTIRRETROVIRALES

Para llevar a cabo los objetivos y resultados del **Capítulo 3**, las MDR en pacientes pretratados con IP, ITIAN, ITINAN e INI se caracterizaron por el programa Stanford HIVdb v8.8 (Universidad de Stanford, Palo Alto, CA, EE. UU.), así como el nivel de sensibilidad previsto para cada ARV. Este programa clasifica las MDR en primarias, secundarias/accesorias y otras (**Figura Suplementaria I.3 - Anexo I**). En cuanto a la sensibilidad a los fármacos, Stanford calcula dando un *score* a las distintas MDR. Según afecten a la sensibilidad de cada uno de los fármacos hace una clasificación del nivel de resistencia: susceptible, resistencia potencial, bajo nivel de resistencia, resistencia intermedia y alto nivel de resistencia.

## BIOMARCADORES INMUNES PROBADOS

Para llevar a cabo los objetivos y resultados del **Capítulo 4** analizamos los niveles de 10 biomarcadores inmunes: B7.1 (proteína de membrana presente en células

presentadoras de antígeno activadas)<sup>205</sup>; B7H5 (supresor de la inmunoglobulina de dominio V de la activación de células T)<sup>206</sup>; IRAK-M (quinasa asociada al receptor de interleucina-1)<sup>205</sup>; Galectin-9 (proteína de unión a glucanos)<sup>207</sup>; Siglec-10 (lectina 10 similar a la inmunoglobulina que se une al ácido siálico)<sup>208</sup>; HIF-1 $\alpha$  (factor 1-alfa inducible por hipoxia, un factor de transcripción)<sup>205</sup>; HVEM (mediador de entrada del virus del herpes)<sup>207</sup>; CD14 (correceptor de lipopolisacárido liberado de monocitos tras la activación)<sup>209</sup>; CD163 (marcador de células activadas por monocitos/macrófagos)<sup>209</sup>, y PD-L1 (ligando 1 de muerte programada)<sup>210,211</sup>. Seleccionamos estos biomarcadores debido a su implicación en la infección por VIH y en otras infecciones o patologías<sup>205,207,209</sup>.

### CUANTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES POR RT-PCR

Para cuantificar estos biomarcadores inmunes en los DBS de cada paciente y generar los resultados para el **Capítulo 4**, se extrajeron los ácidos nucleicos de dos círculos del DBS utilizando la plataforma automatizada NucliSENS EasyMAG (BioMerieux) como se ha explicado anteriormente. El ARN extraído de cada muestra en nuestro laboratorio del Hospital Ramón y Cajal de Madrid se llevó en hielo seco al laboratorio de Inmunología de Tumores en el Instituto de Investigación del Hospital La Paz de Madrid, donde se realizó la medición de biomarcadores, dirigido por el Dr. Eduardo López Collazo. Allí el ADNc se sintetizó a partir de 0,25  $\mu$ g de ARN total extraído usando High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Las reacciones en cadena de la polimerasa cuantitativa de transcripción inversa (RT-qPCR) se realizaron utilizando QuantiMix Easy SYG Kit (Biotools), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los niveles de expresión génica se analizaron utilizando el sistema LightCycler (Roche Diagnostics). El número de copias de ADNc de cada gen de interés se determinó usando una curva estándar de 7 puntos. Las reacciones se realizaron por duplicado y el nivel de expresión del gen  $\beta$ -ACTIN se usó como estándar interno para normalizar los datos en la expresión relativa de cada biomarcador. Todos los cebadores incluían uniones exón-exón para evitar la contaminación del ADN genómico y fueron sintetizados por Europins Genomics. Los cebadores específicos para cada gen se muestran en la **Tabla Suplementaria I.1 - Anexo I**.

## CUANTIFICACIÓN DE LAS INMUNOGLOBULINAS G PROTECTORAS FRENTE A 6 PATÓGENOS VACUNABLES

En el **Capítulo 5** nos propusimos analizar y cuantificar la presencia de inmunoglobulinas G (IgG) protectoras frente a 6 enfermedades prevenibles mediante vacunación: difteria, tétanos, tosferina, sarampión, paperas y rubeola. Para ello, las IgG frente a cada uno de ellos se cuantificaron empleando la técnica de VirClia®IgG (Vircell) a partir de 5 µl de plasma o de 1 círculo de DBS (70 µl de sangre) eluido en 770 µl de solución salina tamponada con fosfato (PBS).

La tecnología de VirClia IgG (Vircell) combina la quimioluminiscencia acoplada a inmunoensayos enzimáticos para amplificar la señal, y usa indistintamente muestras de suero o plasma. Es una reacción donde los anticuerpos de la muestra reaccionan con el antígeno unido a la superficie de poliestireno. Las inmunoglobulinas no unidas por reacción con el antígeno son eliminadas en el proceso de lavado. En un paso posterior, la globulina anti-humana reacciona con el complejo antígeno-anticuerpo, y la que no se une es eliminada por los lavados. La fracción unida reacciona con el sustrato quimioluminiscente, que generará una luminiscencia de brillo prolongado que puede leerse con un luminómetro.

En el **Capítulo 5**, como criterio de positividad, se tomaron los valores de corte (*cut-off*) proporcionados por VirClia para los 6 patógenos empleando plasma/suero (**Tabla II.3**), que proporcionan una sensibilidad del 96-100% y una especificidad del 100%.

**Tabla II.3. Valores de corte de los ensayos VirClia IgG (Vircell) para plasma/suero.**

	Semicuantitativos			Cualitativos		
	Tosferina	Difteria	Tétanos	Sarampión	Paperas	Rubeola
<b>Positivo</b>	>120 UI/ml	≥0,1 UI/ml Protec. máx 0,01-0,09 UI/ml Protec. básica	>0,2 UI/ml	1,1 index	1,1 index	1,1 index
<b>Indeterminado</b>	60 – 120 UI/ml	-	0,1-0,2 UI/ml	0,9-1,1 index	0,9-1,1 index	0,9-1,1 index
<b>Negativo</b>	<60 UI/ml	<0,01 UI/ml	<0,1 UI/ml	<0,9 index	<0,9 index	<0,9 index

**Leyenda Tabla II.3.** UI, unidades internacionales; ml, mililitro; Protec. máx., protección máxima.

Para poder emplear DBS en las mediciones de IgG, se calculó la sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo/negativo para cada una de las 6 mediciones en

DBS de esos 42 niños y adolescentes de estudio. Para ello se tomó como referencia los resultados obtenidos en muestras pareadas de plasmas de los mismos 42 pacientes. Para obtener un punto de corte óptimo que ofreciera la máxima sensibilidad y/o especificidad para la detección en DBS de IgG protectoras contra cada patógeno, se generaron curvas ROC con el *software* R. Los valores indeterminados fueron excluidos de los cálculos finales. El resto de análisis estadísticos se realizaron con el programa Stata.

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La significación estadística a lo largo de toda la Tesis, se calculó mediante una prueba T-Student y el test U Mann-Whitney. Las diferencias en la prevalencia de las variantes del VIH-1 se probaron mediante la prueba T-Student. Se realizaron diversos análisis estadísticos descriptivos en los distintos capítulos como la media, la mediana, el rango intercuartílico (RIC), y el coeficiente de correlación intraclase (CCI). El nivel de significancia utilizado para las pruebas de contraste de hipótesis se estableció en  $p < 0.05$ . Para todos los análisis, se consideraron intervalos de confianza (IC) del 95% y se realizaron con Excel, STATA v11 y GraphPad Prism 8.0.1.

En el **Capítulo 1** se realizó un análisis de correlación mediante la prueba de Spearman Rank, regresión lineal y método Bland-Altman plot para comparar técnicas de cuantificación de CV<sup>212</sup>. Consideramos una diferencia de CV clínicamente relevante cuando entre dos mediciones de CV teníamos, al menos, 0,5 log cp/ml de diferencia, como se describió anteriormente<sup>213–215</sup>.

En el **Capítulo 4** realizamos un análisis de componentes principales utilizando la función princomp del lenguaje R. El método predeterminado realizó un análisis de componentes principales en la matriz de datos numéricos dada y devolvió los resultados como un objeto de clase. El cálculo se realizó mediante una descomposición de valores singulares de la matriz de datos centrada y escalada. El método de impresión de estos objetos y el método de trazado se realizaron utilizando los paquetes R ggplot y ggbiplot. Se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para la comparación general de



los tres grupos. Posteriormente, se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para estudiar las diferencias entre los grupos.

## **NÚMEROS DE ACCESO**

Las secuencias de la PR, RT e IN del VIH-1 generadas durante todo este estudio se enviaron al GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)), base de datos de secuencias genéticas del Instituto de Salud americano (*National Institutes of Health*, NIH), con los siguientes números de acceso: MH920378-MH920435, MN530990-MN531082, y MN998509-MN998523.

## **ASPECTOS ÉTICOS**

Todo el trabajo presentado en esta Tesis se realizó de acuerdo con las pautas éticas de la Declaración de Helsinki de 1964 y fue aprobado por los Comités Éticos de Investigación Clínica del Hospital Monkole y la Universidad de Kinshasa (Kinshasa, RDC), el Hospital Universitario Ramón y Cajal (Madrid, España), la Universidad de Navarra (Pamplona, España) o del Hospital La Paz, según correspondiera a cada estudio concreto. Se obtuvo el consentimiento informado de todos los adultos inscritos y de los padres o tutores de los niños participantes. Todos los métodos se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices y regulaciones pertinentes. Los nombres de los pacientes se codificaron en el muestreo para mantener la confidencialidad.

# Capítulo 1

**Utilidad de las técnicas  
POC Xpert HIV-1 para la  
detección y cuantificación  
de recombinantes  
complejos del VIH-1 en  
Kinshasa, RDC**

## JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Como se ha comentado en la **Introducción**, es necesario el acceso a herramientas moleculares de rutina para el diagnóstico precoz infantil del VIH-1 y para cuantificar la CV en niños y adultos y así poder identificar posibles fracasos del TAR. Sin embargo, la mayoría de los 38 millones de personas infectadas por VIH viven en países de recursos limitados, donde circula un alto número de variantes diferentes del VIH-1, con altas tasas de infección y con acceso limitado o nulo a la monitorización de VIH de rutina<sup>216,217</sup>. Estos lugares tienen acceso insuficiente a instalaciones de laboratorio, deficiencias en el manejo de la cadena de frío y dificultades para la recolección de plasma y el transporte de muestras<sup>217,218</sup>.

Para mejorar la atención de los pacientes expuestos e infectados por el VIH, sería conveniente extender el uso de los nuevos ensayos moleculares POC para el diagnóstico y monitorización del VIH promovidos por la OMS en estos entornos de recursos limitados, más fáciles de emplear y que dan resultados en torno a 90 min<sup>79</sup>. Además promueve el uso de DBS en ausencia de plasma/suero, al ser más fáciles de tomar, almacenar y transportar a los laboratorios de referencia que el plasma o suero<sup>69,85</sup>.

Es ampliamente conocido que la variabilidad genética del VIH puede afectar en la detección molecular y cuantificación del VIH-1<sup>34,84,144,219–222</sup>. Sin embargo, la mayoría de los ensayos POC y no POC no se han evaluado en profundidad con todos los subtipos de VIH-1 y recombinantes complejos presentes en países con alta diversidad genética y alta tasa de infecciones por VIH. Este es el caso de Kinshasa, RDC, epicentro de la epidemia del grupo M del VIH-1<sup>223</sup> donde se espera un gran número de recombinantes del VIH-1 por la circulación simultánea de múltiples variantes<sup>223–230</sup>. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue la eficacia de dos técnicas POC para el diagnóstico precoz infantil (Cepheid Xpert HIV-1 Qual) y cuantificación de la CV (Cepheid Xpert HIV-1 VL) vs. una prueba cuantitativa no POC ampliamente empleada para la monitorización de la viremia en el ámbito clínico (Roche CAP/CTM Quantitative VL test v2.0) empleando el mismo panel de DBS de niños y adultos de Kinshasa, donde circula una gran diversidad de variantes del VIH-1.

Para este estudio se recolectaron 160 DBS tomados en el Hospital de Monkole (Kinshasa, RDC) de abril a noviembre de 2016.

Este estudio se realizó con la colaboración del Departamento de Microbiología de la Clínica Universidad de Navarra y en el Instituto de Investigación Sanitaria de Navarra (IdiSNA) cuyo responsable es el Dr. Reina. Las secuencias de PR, RT y/o IN del VIH-1 fueron depositadas en la base de datos de secuencias de GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)) con los siguientes números de acceso: MH920378-MH920435.

## RESULTADOS

### **Alto porcentaje de diagnósticos falsos positivos mediante pruebas serológicas rápidas en RDC y retraso en el diagnóstico infantil del VIH**

Evaluamos la eficacia de cuantificación del VIH-1 de diferentes técnicas moleculares (POC y no POC) en sangre seca con diferentes subtipos de VIH-1 no-B y recombinantes complejos, principalmente URF. Con ese fin, se recogieron DBS de 85 niños (60 no infectados por VIH, 18 infectados por VIH y 7 expuestos al VIH) y 75 adultos infectados por VIH de Kinshasa, RDC, durante 2016. Las principales características de los pacientes del estudio se pueden observar en la **Tabla 1.1**.

**Tabla 1.1. Características de la población de estudio de Kinshasa (RDC) con DBS tomados en 2016.**

	Niños	Adultos	Total (%)
<b>Número</b>	85 (100%)	75 (100%)	160 (100%)
<b>Género (masculino)</b>	46 (54,1%)	22 (29,3%)	68 (42,5%)
<b>Edad media</b>			
A fecha de toma de DBS (rango)	9,8 (0-18)	46,5 (24,8-73)	26,5 (0-73)
A fecha de diagnóstico en RDC (rango)	8,1 (0-16)	40,4 (0-65,3)	33,7 (0-65,3)
<b>VIH positivos</b>			
Por test rápido en RDC	18 (21,2%)	74 (98,7%)	92 (57,5%)
Por test moleculares y serológicos en España	14 (16,5%)	70 (93,3%)	84 (52,5%)
Falsos positivos por diagnóstico en RDC	4 (4,7%)	4 (5,3%)	8 (5%)
<b>Exposición al TAR entre los 92 diagnosticados como VIH+ en RDC</b>			
ARV <i>naïve</i>	2	10	13
TAR	16*	58*	74
Desconocido	0	7	5
<b>Exposición al TAR entre los 84 VIH+ confirmado en España</b>			
ARV <i>naïve</i>	1	9	10
TAR	13	56	69
Desconocido	0	5	5
<b>Viremia del VIH-1 entre los 69 VIH+ confirmado bajo TAR en RDC</b>			
No detectado solo por Roche-CV	0	1	1
No detectado solo por Xpert-CV	0	4	4
No detectado ni por Roche ni por Xpert-CV	3	5	8
>1,000cp/círculo del DBS por Xpert-CV	3	12	15
>1,000cp/ml por Xpert-CV**	12	52	64
>1,000cp/ círculo del DBS por Roche-CV	6	12	18
>1,000cp/ml por Roche-CV**	12	32	44
<b>Número de regímenes de TAR diferentes entre los 69 pacientes tratados en RDC</b>			
1	10 (76,9%)	34 (60,7%)	44 (63,8%)
2	2 (15,4%)	14 (25%)	16 (23,2%)
3	0	7 (12,5%)	7 (10,1%)
4	1 (7,7%)	1 (1,8%)	2 (2,9%)
<b>Experiencia a ITIAN</b>			
3TC	13	58	71
AZT	10	46	56
TDF	5	27	32
DDI	0	3	3
ABC	0	4	4
<b>Experiencia a ITINAN</b>			
NVP	10	43	53
EFV	6	29	35
<b>Experiencia a IP</b>			
LPV/r	1	7	8
<b>Pacientes VIH+ con secuencia <i>pol</i> disponible</b>			
	13 (92,8%)	45 (64,3%)	58 (69%)
<b>Variante del VIH-1 por <i>phy</i></b>			
Subtipos no-B	2/13 (15,4%)	4/45 (8,9%)	6 (10,3%)
CRF	2/13 (15,4%)	8/45 (17,8%)	10 (17,3%)
URF	9/13 (69,2%)	33/45 (73,3%)	42 (72,4%)

**Leyenda Tabla 1.1.** RDC, República Democrática del Congo; DBS, *dried blood spots* o muestra de sangre seca; TAR, tratamiento antirretroviral; ARV, antirretroviral; CV, carga viral del VIH-1; ITIAN, inhibidores de la retrotranscriptasa análogos de nucleós(t)idos; ITINAN, inhibidores de la transcriptasa inversa no

análogos de nucleós(t)ido; IP, inhibidores de la proteasa; 3TC, Lamivudina; AZT, Zidovudina; TDF, Tenofovir; DDI, Didanosina; ABC, Abacavir; NVP, Nevirapina; EFV, Efavirenz; LVP/r, Lopinavir/Ritonavir; phy, análisis filogenético; CRF, formas recombinantes circulantes; URF, formas recombinantes únicas. \*Entre los 74 pacientes tratados en RDC, 3 niños y 2 adultos fueron falsos positivos. \*\*cp/ml en plasma, corregido considerando el hematocrito.

Los 160 sujetos del estudio fueron mayoritariamente seropositivos mediante pruebas serológicas rápidas en RDC (58,75%). De ellos, más de la mitad (57,5%) eran mujeres, y un 46,2% tenían experiencia antirretroviral. La edad media para el diagnóstico de VIH en RDC fue de 8,1 años (DE  $\pm 5,38$ ) en niños y 40,4 (DE  $\pm 12,13$ ) en adultos. La edad media a toma de DBS fue de 9,8 años (DE  $\pm 5,11$ ) en niños y 46,5 (DE  $\pm 12,27$ ) en adultos. La mayoría de los adultos eran mujeres (70,7%). Todos menos uno de los niños nacieron en Kinshasa, el 8,2% eran huérfanos y 6 presentaron infección de VIH con *Mycobacterium tuberculosis*.

Entre los 92 niños y adultos diagnosticados como VIH positivos mediante pruebas rápidas en RDC, el 80,4% tenían experiencia previa al tratamiento con ARV. El resto, eran *naïve* al TAR o con datos de tratamiento desconocidos. Los ARV más usados en la cohorte del estudio fueron ITIAN e ITINAN. Se prescribieron AZT+3TC+NVP en 60 pacientes (13 niños y 47 adultos), principalmente como terapia de primera línea (50 casos). Solo 8 pacientes recibieron tratamiento basado en IP con lopinavir/ritonavir (LPV/r), mientras que el uso de INI estuvo ausente en los pacientes del estudio (**Tabla 1.1**).

### **Falsos diagnósticos positivos en RDC**

La infección por VIH-1 fue confirmada por Xpert-Qual en 16,5% de los 85 niños testados y por Xpert-CV y Roche-CV en 93,3% de los 75 adultos con VIH diagnosticados en RDC. Sin embargo, identificamos algunos falsos positivos según el algoritmo de diagnóstico serológico con pruebas rápidas realizado en RDC. Así, encontramos 8 falsos positivos; 4 en adultos (rango 23,8-28,5 años) y en 4 niños (rango 5,3-13,1 años). Además, 5 de ellos (2 adultos y 3 niños) habían estado innecesariamente tomando TAR durante un tiempo medio de 3,9 años (**Tabla 1.2**).

Xpert-Qual confirmó la ausencia de infección por VIH-1 en 4 DBS de niños diagnosticados erróneamente como VIH positivos en RDC. Hubo otros 8 casos VIH

negativos que dieron un resultado indeterminado en Geenius BioRad y que se confirmó la ausencia de VIH gracias a Xpert-Qual.

Los 4 falsos positivos en adultos proporcionaron resultados negativos por los dos ensayos de CV (Roche y Xpert), dando tres de ellos resultados negativos por dos inmunoensayos de 4ª generación (Roche Elecsys® VIH combi PT y bioMérieux VIDAS® VIH Duo Quick) y, en el caso restante, solamente mediante ensayo VIDAS. Por lo tanto, la tasa de diagnósticos falsos positivos de VIH-1 entre la población expuesta al VIH fue del 22,2% (4/18) en niños y del 5,3% (4/75) en los adultos infectados por el VIH.



Tabla 1.2. Niños y adultos de Kinshasa con falso diagnóstico de VIH positivo en RDC tras emplear pruebas serológicas rápidas.

	ID paciente	Experiencia ARV	Tiempo en TAR (meses)	Ensayos realizados en RDC					Ensayos realizados en España							
				Determine	Uni- Gold	Double Check	Diagnóstico definitivo	Edad al diagnóstico (años)	Elecsys Roche	Vidas Duo Quick	BioRad Geenius	Xpert Qual	Roche CV	Xpert CV	Diagnóstico definitivo	Edad al diagnóstico (años)
Niños	P6	AZT+3TC+NVP	96	Pos	Pos	Pos	Pos	Desconocido	-	-	Neg	Neg	-	-	Neg	9,11
	P12	AZT+3TC+NVP	21	Pos	Pos	Pos	Pos	0,55	-	-	Neg	Neg	-	-	Neg	5,36
	P14	AZT+3TC+NVP	22,4	Pos	Pos	Pos	Pos	3,57	-	-	Ind	Neg	-	-	Neg	8,64
	N18	Naive	0	Pos	Pos	Pos	Pos	6,77	-	-	Ind	Neg	-	-	Neg	13,17
Adultos	CUN84	AZT+3TC+NVP	176,4	Pos	Pos	-	Pos	Desconocido	Pos	Neg	Neg	-	Neg	Neg	Neg	24,7
	CUN33	Naive	0	Pos	Pos	-	Pos	0	Neg	Neg	Neg	-	Neg	Neg	Neg	28,7
	CUN41	AZT+3TC+EFV	87	Pos	Pos	-	Pos	28,5	Neg	Neg	Neg	-	Neg	Neg	Neg	Desconocido
	CUN109	Naive	0	Pos	Pos	-	Pos	51	Neg	Neg	Neg	-	Neg	Neg	Neg	29,07

**Leyenda Tabla 1.2.** Diagnóstico VIH en RDC: Determine, test rápido Determine™ HIV-1/2 Ag/Ab (Alere)<sup>231</sup>; Uni-Gold, Uni-Gold HIV (Trinity Biotech)<sup>232</sup> y Double-Check, Double-Check Gold HIV 1&2 (Orgenics)<sup>233</sup>. Diagnóstico VIH en España: Elecsys Roche, 4<sup>th</sup> gen immunoassay Elecsys® HIV combi PT (Roche)<sup>234</sup>; VIDAS DUO Quick, 4<sup>th</sup> gen immunoassay VIDAS® HIV Duo Quick (bioMérieux)<sup>235</sup>; BioRad Geenius, BioRad Geenius™ HIV-1/2<sup>236</sup>; Xpert Qual, Cepheid Xpert Qual<sup>193</sup>; Xpert-CV, Cepheid Xpert HIV-1 VL<sup>194</sup>; Roche-CV, COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test v2.0<sup>237</sup>. ARV, antirretrovirales; AZT, Zidovudina; 3TC, Lamivudina; NVP, Nevirapina; EFV, Efavirenz; VL, viral load; guión, no hecho; Ind, indeterminado; Neg, VIH negativo; Pos, VIH positivo.

### Correcta detección de variantes de VIH-1 en Kinshasa por Xpert-CV y Roche-CV

Entre los 84 DBS con VIH confirmado, excluyendo las muestras clasificadas como falsos positivos, Xpert-CV pudo detectar el 95,2% y Roche-CV el 97,6% de ellas (Tabla 1.3). Entre esas muestras con ARN de VIH detectable, y comparando la viremia detectada por las dos técnicas cuantitativas empleadas, Xpert-CV vs. Roche-CV fueron capaces de cuantificar y proporcionar valores de CV en los DBS ( $\geq 40$  vs.  $\geq 20$  cp/círculo del DBS o  $\geq 936$ –1078 vs.  $\geq 468$ –539 cp/ml plasma tras corregir por hematocrito) para 65 (77,4%) vs. 66 (78,6%) muestras de DBS, respectivamente. La mayoría (92,9%) de los 14 niños con VIH presentaron CV cuantificable por Xpert-CV ( $\geq 40$  cp/círculo DBS) y Roche-CV ( $\geq 20$  cp/círculo DBS) y el 74,3% o 72,8% de los 70 adultos con VIH por Xpert-CV o Roche-CV, respectivamente. Xpert-CV detectó 2 muestras no detectadas por Roche-CV ( $< 20$  cp/ml), mientras que Roche-CV pudo detectar 4 muestras por debajo del límite de detección de Xpert-CV ( $< 40$  cp/ml) (Tabla 1.3).

**Tabla 1.3. Cuantificación de la CV del VIH-1 en 84 DBS de 14 niños y 70 adultos con VIH usando dos ensayos moleculares.**

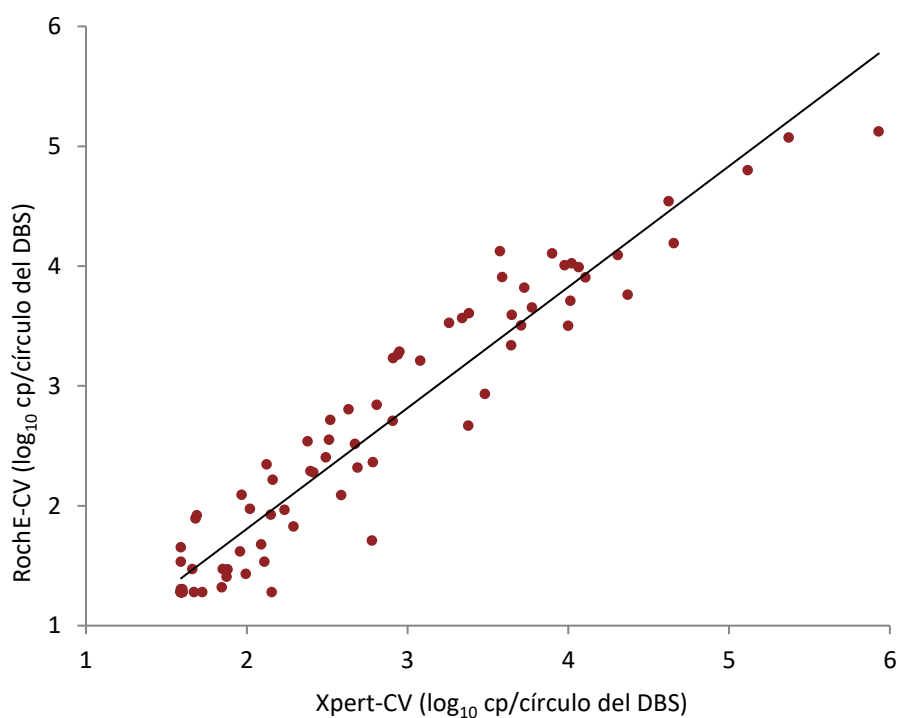
			Xpert-CV (ensayo POC)					
			No detectado	Detectado no cuantificado <40 cp/círculo	Cuantificado ≥40cp/círculo			Nº DBS
					40-1.000 cp/círculo	>1.000 cp/círculo	Ct media [rango]	
Roche-CV (ensayo no-POC)	No detectado		-	2	0	0	0	2
	Detectado no cuantificado <20 cp/círculo		4	9	3	0	34,1 [30,1-36,6]	16
	Cuantificado ≥20 cp/círculo	≥20-39cp/DBS	0	3	7	0	32,5 [31,8-34,2]	10
		40-1.000 cp/círculo	0	1	25	2	30,3 [28,2-32,8]	28
		>1.000cp/círculo	0	0	3	25	25,2 [20,3-27,4]	28
		Ct media [rango]	0	39,6 [33,2-42,6]	36,3 [33,9-41,8]	30,2 [23,6-33,6]	-	-
	Nº DBS		4	15	38	27	-	84
	Secuencias <i>pol</i> disponibles		nd	4 (26,7%)	27 (71%)	27 (100%)		58 (69%)
Recombinantes complejos (CRF + URF)		nd	4	23	25	-	52	
Variantes no-B		nd	0	4	2	-	6	

**Leyenda Tabla 1.3.** Nº, número; CV, carga viral del VIH; POC, *point of care* o técnica en el punto de atención; DBS, *dried blood spots* o muestra de sangre seca; cp/círculo, copias de ARN del VIH-1 por círculo del DBS o sangre seca; nd, secuencias no disponibles por baja CV; Ct, ciclo específico o *cycle threshold*. Los valores de Ct se correlacionan inversamente con la concentración inicial de genoma viral en muestras infectadas.

### Alta correlación entre las técnicas Xpert y Roche CV en DBS

Los resultados de CV, dentro del rango de cuantificación de ambas técnicas, estuvieron disponibles para 78 (92,8%) de 84 pacientes con VIH. Se observó una concordancia excelente ( $\text{CCI} = 1$ ) y una correlación alta y significativa en la cuantificación de CV entre ambas técnicas ( $R^2 = 0,89$ ,  $P < 0,001$ ), como muestra la línea de regresión estimada (**Fig. 1.1**). Sin embargo, los valores de Ct observados fueron dependientes del ensayo de CV y diferentes en los 78 DBS detectados por ambas técnicas de CV (**Tabla 1.3**). Xpert-CV proporcionó una Ct media más alta ( $34,75 \text{ DE} \pm 7,7$ , rango [23,6–42,6]) que Roche-CV ( $29,4 \text{ DE} \pm 3,77$ , [20,3–36,6]) en el panel. Ello dio lugar a una CV media por Xpert-CV de  $4,22 \text{ log cp/ml DE} \pm 1,06$  ( $2,76 \text{ log cp/círculo DE} \pm 1,16$ ) y el promedio de CV por Roche-CV fue de  $4,04 \text{ log cp/ml DE} \pm 1,12$  ( $2,57 \text{ log cp/círculo DE} \pm 1,12$ ).

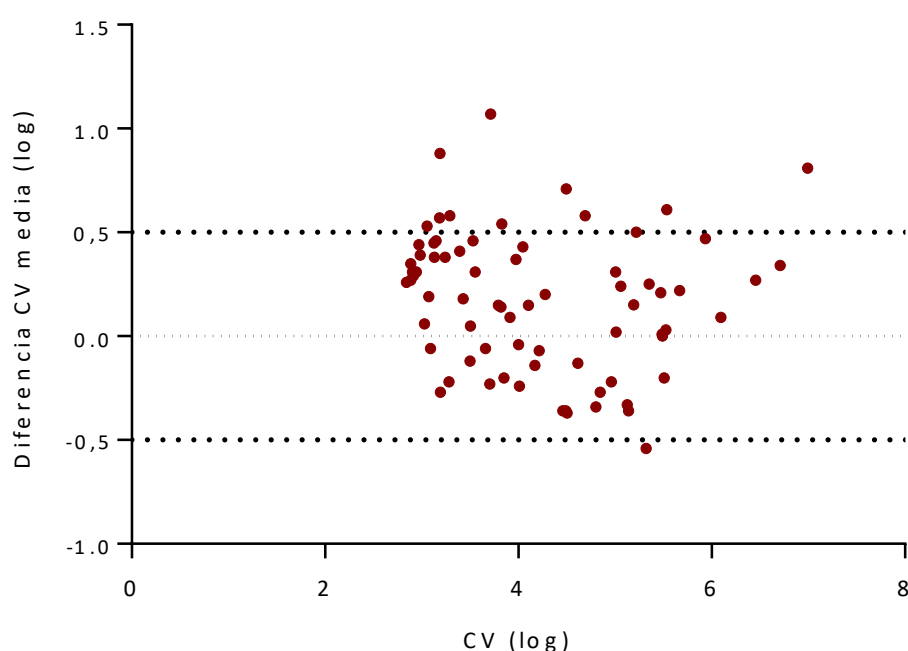
**Figura 1.1. Correlación entre los ensayos Xpert-CV y Roche-CV en 78 muestras con VIH con CV cuantificada.**



**Leyenda Figura 1.1.** Diagrama de dispersión con un análisis de regresión lineal simple de las 78 muestras (14 niños y 64 adultos) que se cuantificaron por ambos ensayos, ( $\text{CV} \geq 40$  o  $\geq 20 \text{ cp/ml}$ , respectivamente). Gráfico usando la CV directa de un círculo de DBS (copias de ARN del VIH-1 por círculo del DBS). CV, carga viral.

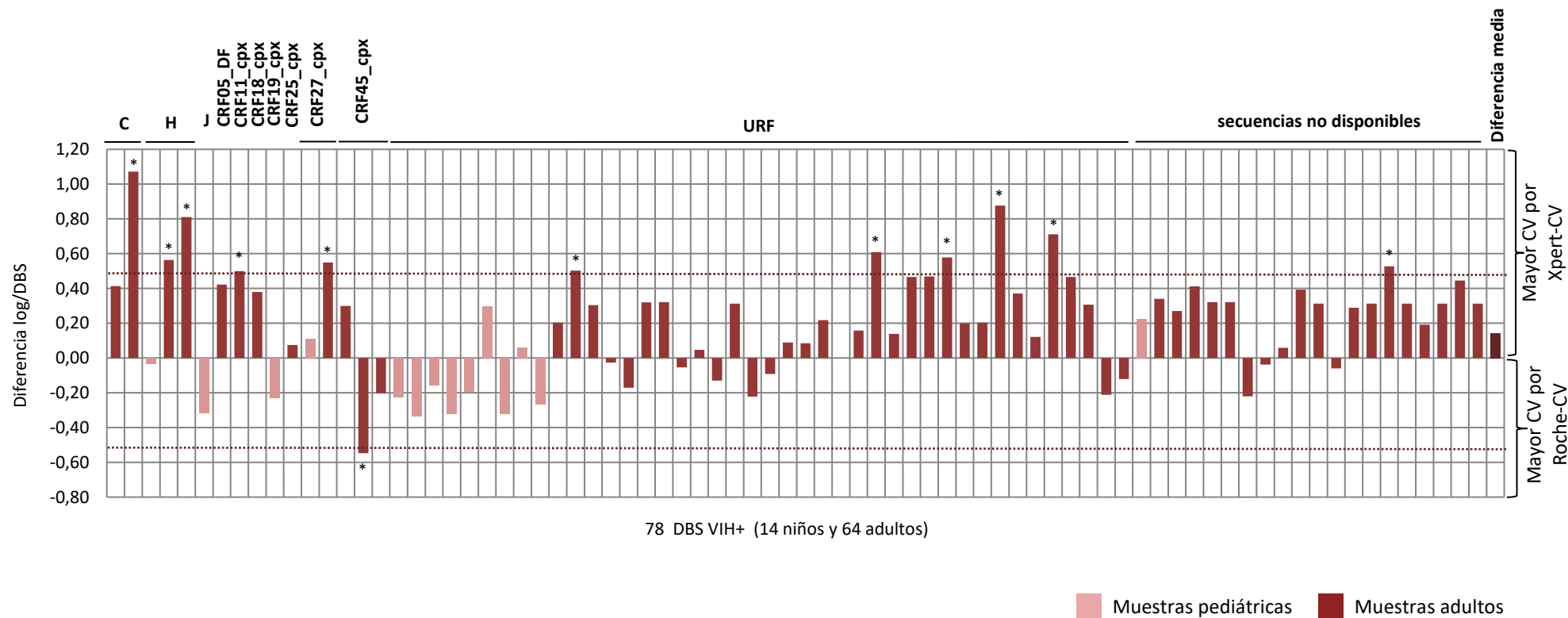
Las similitudes entre ambas técnicas de CV se evaluaron mediante el método de trazado de Bland-Altman (**Fig. 1.2**). La sobreestimación de la CV del VIH-1 por una de las dos técnicas (Xpert-CV o Roche-CV) se observó en todas las muestras menos en una entre los 78 DBS, aunque la diferencia fue inferior a un umbral clínicamente relevante de 0,5 log cp/ml en la mayoría de los casos (84,6%).

**Figura 1.2. Análisis Bland-Altman mostrando diferencias de la CV del VIH-1 media comparando Xpert-CV y Roche-CV en 78 pacientes infectados con muestras cuantificadas por ambos ensayos.**



El ensayo POC Xpert-CV tendió a sobrestimar la CV del VIH-1 en el 69,2% de las muestras, y el no POC Roche-CV en el 29,5% de las muestras (**Fig. 1.3, Tabla 1.3**). La diferencia media general en los valores de ARN del VIH-1 obtenidos mediante las técnicas Xpert-CV y Roche-CV fue de 0,30 log cp/círculo DBS (IC 95%: 0,26 a 0,35 log cp/círculo DBS) ( $p < 0,001$ ). Sin embargo, se observaron diferencias clínicamente relevantes ( $\geq 0,5$  log CV) que van desde -0,55 a 1,07 en 12 (15,4%) de las 78 muestras de DBS con CV por encima del límite de detección en ambos ensayos (**Fig. 1.2 y 1.3 y Tabla Sup. II.1**). Once casos correspondieron al uso de Xpert-CV, mientras que solo uno a las pruebas de Roche-CV (**Tabla 1.3**).

Figura 1.3. Diferencias en la CV del VIH-1 entre Xpert-CV y Roche-CV en 78 pacientes infectados y cuantificados por ambos ensayos y las variantes del VIH-1 en 58 muestras con secuencia disponible.



**Leyenda Figura 1.3.** CV, carga viral; 58 variantes no-B en la población de estudio: 2C, 3H, 1J, 1CRF05\_DF, 1CRF11\_cpx, 1 CRF18\_cpx, 1CRF19\_cpx, 1 CRF25\_cpx, 2 CRF27\_cpx, 3 CRF45\_cpx y 42 URFs. La ausencia de barra en un URF indica que la CV es la misma por ambos ensayos en dicha muestra. CRF, formas recombinantes circulantes; URF, formas recombinantes únicas; \*, diferencia en la CV > 0,5 log, considerada clínicamente significativa. Más información en **Tabla Suplementaria II.1.**

### **Alto porcentaje de recombinantes complejos en RDC e impacto en la cuantificación viral**

La secuencia *pol* del VIH-1 se recuperó en 58 de los 84 individuos con VIH+ (13 niños y 45 adultos) y se analizó por filogenia. Entre las 58 secuencias virales obtenidas, identificamos 6 (10,4%) subtipos no B (2C, 3H, 1J), diez CRF (17,2%) (1 CRF05\_DF, 1 CRF11\_cpx, 1 CRF18\_cpx, 1 CRF19\_cpx, 1 CRF25\_cpx, 2 CRF27\_cpx, 3 CRF45\_cpx) y 42 URF (72,4%). Por lo tanto, la mayoría (89,6%) de las 58 secuencias de VIH-1 obtenidas fueron recombinantes (**Tabla 1.1**). No se encontraron infecciones por VIH-2, ni por grupos no-M del VIH-1 en nuestra población de estudio. Ambas técnicas de CV pudieron detectar y cuantificar todas las variantes, incluidos los CRF y URF de la cohorte analizada (**Tabla 1.3**).

El impacto de los recombinantes complejos en la cuantificación de CV no estaba claro (**Tabla 1.3, Tabla Supl. II.1 - Anexo II y Fig. 1.3**). Entre los 42 URF detectados, el 61,9% proporcionó una CV más alta por Xpert-CV y el 35,7% por Roche-CV. Entre las 10 muestras atribuidas a 7 CRF diferentes, el 70% mostró una mayor CV por Xpert-CV y el 30% por Roche-CV. Los subtipos C y H mostraron valores de viremia más altos por Xpert-CV y el subtipo J por Roche-CV.

## **DISCUSIÓN**

En este capítulo se evalúa la utilidad de nuevas técnicas POC para el diagnóstico precoz del VIH-1 y para la cuantificación de la CV en variantes complejas del VIH-1, mayoritarias en nuestra población de estudio. El uso de las técnicas POC puede mejorar el manejo clínico de niños y adultos infectados por VIH y reducir el retraso en el diagnóstico y en la identificación de fallos del TAR<sup>69</sup>. El diagnóstico precoz del lactante es una prioridad de la OMS<sup>69,238</sup>, ya que permite establecer el TAR temprano y reduce el daño irreversible del sistema nervioso central e inmune, disminuye el tamaño de los reservorios virales, la transmisión del VIH y la morbilidad/mortalidad asociadas con la infección por VIH-1<sup>239</sup>. Un diagnóstico temprano correcto del VIH resulta esencial, ya que los resultados falsos positivos pueden generar un TAR innecesario y angustia psicológica en individuos y familias con diagnóstico erróneos<sup>240</sup>. El uso de DBS se ha propuesto como una muestra alternativa al plasma/suero, más fácil de recolectar,

almacenar y enviar, muy conveniente en países con recursos limitados<sup>68,85,97,241</sup>. El objetivo de este estudio fue evaluar dos técnicas POC (Xpert-CV y Xpert Qual) para la detección y/o cuantificación del VIH utilizando DBS en RDC, un país con una alta diversidad de VIH-1 que incluye una alta prevalencia de recombinantes complejos, principalmente URF.

Aunque las pruebas moleculares POC evitan el diagnóstico serológico de VIH inapropiado y son rentables<sup>242</sup>, aún no se adoptan globalmente en todos los programas de diagnóstico precoz infantil o de adultos<sup>238</sup>. En RDC, el Programa Nacional de Lucha contra el VIH-SIDA (PNLS) recomienda realizar el diagnóstico del recién nacido entre 0-2 días después del nacimiento. Sin embargo, los ensayos POC para el diagnóstico precoz infantil del VIH aún no se han implementado dentro de la rutina clínica en los bebés expuestos al VIH.

En este trabajo se ha evaluado el impacto clínico de la falta de pruebas moleculares para el diagnóstico del virus de rutina en recién nacidos expuestos al VIH y de pruebas serológicas confirmatorias en niños y adultos en una cohorte de Kinshasa. Encontramos diagnósticos falsos positivos en el 5% de los participantes del estudio (4 niños y 4 adultos) que condujeron a implantar un TAR innecesario en 5 sujetos no infectados por VIH a toma de muestra.

La alta prevalencia de diagnósticos falsos positivos entre los lactantes menores de 18 meses expuestos al VIH podría explicarse por el largo retraso, de hasta 6 meses, en recibir los resultados de la PCR o de pruebas confirmatorias desde un laboratorio nacional centralizado hasta el hospital congoleño. Los diagnósticos incorrectos en recién nacidos también podrían haber sido consecuencia de la ausencia de una prueba molecular confirmatoria con una segunda muestra, según lo recomendado por la OMS<sup>69</sup>. En niños mayores y adultos, el diagnóstico erróneo del VIH puede deberse a la ausencia local de análisis serológicos confirmatorios y al uso exclusivo de pruebas serológicas rápidas para el diagnóstico del VIH. Aunque se recomiendan pruebas inmunocromatográficas rápidas para el VIH en países de bajos ingresos<sup>243</sup>, la baja prevalencia del VIH entre la población general en RDC (0,7%)<sup>216</sup> puede estar asociada con un menor valor predictivo positivo para estos métodos. Además, las pruebas rápidas del VIH no son apropiadas para el diagnóstico de infección aguda<sup>243</sup>. Otro aspecto que

podría influir en un diagnóstico erróneo es la subjetividad a la hora de interpretar los resultados de las pruebas rápidas de VIH (dependientes del observador), que puede aumentar los diagnósticos falsos positivos. La alta edad media (8,1 años) en el diagnóstico de VIH en niños de la cohorte de estudio, también sugeriría un retraso en el diagnóstico del VIH, ya que la mayoría de ellos adquirieron la infección por VIH por vía vertical, según los informes clínicos.

Los resultados también muestran que las técnicas moleculares Xpert y Roche fueron superiores a los ensayos de detección serológica de 4ª generación para identificar la infección por VIH en niños mayores de 18 meses y adultos expuestos al VIH. Además, Xpert resolvió el estado de pacientes expuestos al VIH y descartó la infección por VIH en 10 individuos con resultados indeterminados por el ensayo confirmatorio de Geenius, de acuerdo con estudios recientes<sup>244</sup>. Esto podría deberse al hecho de que Xpert HIV-1 Qual puede detectar infecciones por VIH-1 hasta 7-10 días antes de la seroconversión, unos 9 días antes que un panel de pruebas de anticuerpos contra VIH-1 y 5 días antes que un panel de pruebas de antígeno VIH-1 p24<sup>193</sup>. Xpert® HIV-1 Qual puede desempeñar un papel importante en el diagnóstico del VIH, ya sea en diagnóstico precoz infantil, como prueba confirmatoria después de una prueba basada en anticuerpos o para la detección de infección aguda por VIH en pacientes con anticuerpos negativos recientemente infectados<sup>245</sup>.

Las técnicas POC Xpert-CV y no POC Roche-CV también fueron adecuadas para cuantificar CV usando DBS en RDC. Un alto porcentaje de pacientes bajo TAR mostró niveles de CV superiores a 1.000 cp/ml por Xpert (92,7%) o Roche (63,8%) (**Tabla II.2**), el umbral de CV definido por la OMS para confirmar fallo virológico en países de bajos y medios ingresos y cuando se utiliza DBS en adultos y niños<sup>68</sup>. Este es el umbral óptimo para determinar el menor porcentaje posible de falsos diagnósticos<sup>241</sup>. De hecho, la mayoría de los pacientes en el estudio tenían sospecha clínica de fallo virológico. Sin embargo, la prevalencia de fallo de tratamiento se sobreestimó usando Roche-CV y este umbral, resultó ser menos específico que otras técnicas cuantitativas usando DBS, como se describió en estudios anteriores<sup>106,241</sup>.

A pesar de la buena correlación en la CV usando Xpert-CV vs. Roche-CV, el 15,4% de las 78 muestras con CV cuantificada por ambas técnicas, presentaron diferencias de CV



clínicamente significativas ( $>0,5$  log cp/ml), lo mismo que se observó en estudios previos<sup>34,144,246</sup>. Por lo tanto, recomendamos ampliar el uso de CV en RDC para una detección temprana del fallo virológico. Además, la técnica de cuantificación de CV debería ser siempre la misma durante todo el seguimiento clínico del paciente para reducir las posibles sobreestimaciones de CV asociadas a la técnica usada, lo que podría interpretarse como falsos eventos de fallo virológico. Esto podría reducir los cambios innecesarios en el régimen de TAR en estos pacientes, favoreciendo una respuesta clínica precoz, y reforzando la adherencia o cambiando el régimen del TAR si se detectan variantes resistentes antes de que aparezcan los síntomas clínicos asociados al fracaso del tratamiento. Lograr los objetivos 95-95-95 del Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA (ONUSIDA) para 2030 depende de la vigilancia del VIH; de lo contrario, puede producirse una epidemia futura de cepas resistentes al VIH y retrasar estos objetivos en África Subsahariana<sup>247</sup>. El hallazgo de valores de Ct dependientes de la técnica de cuantificación del VIH-1, refuerza el riesgo de establecer un límite de Ct estándar como valor umbral preciso para diferenciar fallos virológicos en pacientes con TAR.

La evolución continua del VIH puede dificultar el diagnóstico y complicar la práctica clínica<sup>248</sup>. Por lo tanto, uno de los principales desafíos para el diagnóstico molecular y los ensayos de CV es detectar y/o cuantificar correctamente diferentes variantes del VIH-1. Según la información del fabricante, el ensayo Xpert® HIV-1 Qual ha sido validado para muestras que incluyen los grupos N, O y M (9 subtipos y recombinantes A/E, A/B y AG/GH)<sup>193</sup> y el Xpert-CV para grupos N, O y M (9 subtipos, CRF01\_AE, CRF02\_AG y CRF03\_AB)<sup>194</sup>. Sin embargo, en la mayoría de los 102 VIH-1 CRF<sup>19</sup> y URF aún no se han validado. Según la casa comercial, Roche-CV era capaz de cuantificar variantes del grupo O y de los subtipos A-H del grupo M del VIH-1 crecidos en cultivo celular<sup>195,237</sup>, aunque también fue capaz de cuantificar varios CRF<sup>144</sup>. Sin embargo, ninguno de ellos ha sido evaluado en un gran panel de variantes URF. Así, nuestro estudio demuestra, por primera vez, que las técnicas POC Xpert-Qual y Xpert-CV y la técnica cuantitativa no-POC Roche-CV pueden detectar y cuantificar con éxito recombinantes complejas en *pol*.

Estudios previos han informado de diferencias clínicamente significativas ( $>0,5$  log) en la cuantificación de CV entre técnicas con las mismas cepas no-B<sup>34,249–251</sup>. Estos

resultados sugerirían diferentes tasas de detección entre las técnicas debido a la variabilidad genética en la región del gen diana del VIH-1 de cada técnica en muestras cuantificadas incorrectamente, como se demostró previamente para una variante CRF02\_AG<sup>249</sup>. En evaluaciones previas se ha confirmado la eficacia de la tecnología Xpert para la detección y cuantificación de las variantes no-B del VIH-1<sup>250,252–254</sup>, destacando la utilidad de Xpert en áreas con una alta variabilidad genética del VIH, como África Subsahariana<sup>246,255–258</sup>.

También proporcionamos nuevos datos relacionados con la epidemiología molecular del VIH en Kinshasa, informando de una tasa extremadamente alta de recombinantes únicos en poblaciones recientemente infectadas. Sin embargo, la prevalencia de URF podría subestimarse, ya que las variantes de VIH-1 se caracterizaron considerando solo el gen *pol* y no el genoma completo. Otros autores también han destacado la extrema diversidad de las cepas de VIH que circulan en el país con una alta presencia de URF y diferentes CRF, junto con una baja presencia del subtipo C<sup>228,229</sup>. En el **Capítulo 2** de esta **Tesis** profundizaremos en la Epidemiología Molecular del VIH-1 en RDC desde el principio de la epidemia hasta 2018.

La técnica POC Xpert para el diagnóstico de otras enfermedades como tuberculosis<sup>259</sup>, shigelosis<sup>260</sup> o el virus de la viruela del simio<sup>261</sup> ya se ha utilizado en RDC. El PNLS en este país planea usar las máquinas Xpert existentes para las pruebas de diagnóstico precoz infantil del VIH en menores de 18 meses expuestos al virus y para la monitorización de la CV para ver la eficacia terapéutica tras el TAR, y así mejorar la atención clínica de niños y adultos infectados. Nuestros resultados demuestran que el rendimiento de Xpert es adecuado para analizar las variantes de VIH-1 que circulan actualmente en RDC. Por lo tanto, debido a su simplicidad, los resultados rápidos y el buen desempeño, creemos que Xpert HIV-1 puede ser útil en la descentralización del monitoreo de diagnóstico precoz infantil y CV desde laboratorios especializados en RDC a hospitales y clínicas locales. Esto ayudará a alcanzar los ambiciosos objetivos 95-95-95 en el país. También confirmamos que los DBS podrían ser una muestra adecuada para el uso de Xpert en RDC, ya que requieren un volumen mínimo de sangre, favoreciendo las pruebas moleculares en bebés y niños de bajo peso<sup>68</sup>.

Una limitación importante de este estudio es que no comparamos DBS con plasma debido a la falta de muestras pareadas recolectadas para cada sujeto en la población de estudio. Además, debido al diseño del estudio y el tamaño de la muestra, no pudimos determinar el poder estadístico de las posibles diferencias de rendimiento entre los ensayos en cada variante específica de VIH-1. Finalmente, no pudimos explorar el efecto del tampón de lisis para DBS en la cuantificación de la viremia, lo que podría influir en los resultados de CV de DBS según estudios anteriores<sup>262</sup>.

Sin embargo, la principal fortaleza de nuestro estudio es que muestra los primeros resultados que confirman la utilidad de las técnicas POC Xpert HIV-1 y la plataforma Roche-CV en el diagnóstico temprano de VIH-1 y en la cuantificación de la CV de recombinantes complejos (principalmente URF) que circulan actualmente en Kinshasa. Hasta donde sabemos, no hay estudios previos que hayan incluido un panel tan grande de recombinantes complejos diferentes del VIH-1 caracterizados por análisis filogenético durante la evaluación de Xpert POC HIV-1 para diagnóstico precoz infantil y CV. También informamos de algunas de las limitaciones actuales del diagnóstico y monitoreo del VIH en RDC. Los ensayos Xpert y el uso de DBS pueden mejorar el diagnóstico temprano en los bebés expuestos al VIH y la detección temprana de fallo del TAR en países con recombinantes complejos de VIH-1 e infraestructuras limitadas, como RDC. Nuestros resultados podrían tener un impacto clínico directo en el diagnóstico y monitoreo global del VIH para alcanzar temprano los objetivos 95-95-95 en el país para 2030.

## DIVULGACIÓN

El trabajo descrito en este capítulo fue publicado como artículo de investigación incluido en el **Anexo V**:

Rubio-Garrido M., Ndarabu A., Reina G, Barquín D., Fernández-Alonso M., Carlos S., Holguín A. Utility Of POC Xpert HIV-1 Tests For Detection-Quantification Of Complex HIV Recombinants Using Dried Blood Spots From Kinshasa, D. R. Congo. *Scientific Reports* **9**, 5679 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41963-y>. Factor de impacto: 4,122 (Q1).

Fue presentado en los siguientes congresos:

- Póster nº 566 en 25th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections 2018 (Boston, EEUU). Rubio-Garrido M., Ndarabu A., Reina G., Barquín D., Carlos S., Holguín A. *Utility of POC Xpert HIV-1 Tests for Detection-Quantification of Complex Recombinants*.
- Póster nº P-080 en IX Congreso Nacional GeSIDA 2017 (Vigo, España). Rubio-Garrido M., Ndarabu A., Reina G., Barquín D., Carlos S., Holguín A. *Evaluación de técnicas point of care (POC) para el diagnóstico precoz y cuantificación del VIH-1 en DBS de variantes no-B de República Democrática del Congo*.

En 2019 se publicó en diversos medios de comunicación escrita general a nivel nacional, algunos ejemplos son:

- RTVE: <https://www.rtve.es/noticias/20190604/unas-gotas-sangre-permitiran-diagnostico-mas-rapido-del-vih-africa/1951340.shtml>
- Ciber-ISCIII: <https://www.ciberisciii.es/noticias/nuevo-hito-en-el-diagnostico-rapido-del-vih-en-%C3%A1frica>
- Publico: <https://www.publico.es/sociedad/vih-nueva-tecnica-permite-diagnostico-rapido-vih-africa.html>
- Infosalus: <https://www.infosalus.com/asistencia/noticia-point-of-care-tecnica-permite-diagnosticar-vih-dos-gotas-sangre-seca-20190604120204.htm>

# Capítulo 2

# **Actualización y evolución molecular de la epidemia del VIH-1 en población pediátrica y adulta de Kinshasa, RDC**

## JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Como ya se ha comentado en el apartado de “Variantes genéticas del VIH-1” de la **Introducción**, la variabilidad del VIH-1 puede afectar múltiples áreas, como son la transmisión, patogénesis, progresión de la enfermedad<sup>42,263,264</sup>, la monitorización del VIH<sup>144,265</sup> o las vías de resistencia<sup>266</sup> entre otros. El estudio de las variantes del VIH puede permitir una mejor comprensión de la expansión global del virus<sup>267–269</sup> identificando nuevas variantes, como la reciente descripción del subtipo L<sup>17</sup>. Los estudios de vigilancia de la epidemiología molecular del VIH-1 son importantes a nivel mundial y de interés en cualquier entorno. Pero son aún más interesantes en un área con una alta diversidad viral, origen de la pandemia de VIH-1, donde el virus ha estado circulando durante más tiempo y podrían surgir nuevas variantes más patógenas o transmisibles. Las secuencias de VIH-1 más ancestrales se recuperaron en Kinshasa en 1959 (ZR59, cerca del nodo ancestral de los subtipos B y D)<sup>270</sup>, 1960 (DRC60, subtipo A)<sup>223</sup> y 1966, (DRC66, subtipo C)<sup>271</sup>. El subtipo B también surgió en Kinshasa y se introdujo en Haití alrededor de 1966 por la migración humana, expandiéndose posteriormente a otras regiones, como los Estados Unidos de América, Europa, Asia, América Latina y Australia<sup>268</sup>.

En consecuencia, Kinshasa es uno de los lugares más relevantes para llevar a cabo programas de vigilancia de variantes virales y aumentar el conocimiento de la epidemiología molecular y la evolución viral del VIH. En ese contexto, nuestro estudio presenta los datos más recientes relacionados con las variantes de VIH-1 circulantes en la región viral *pol* (codificante de las proteínas Pol del VIH-1) en Kinshasa durante el periodo 2016-2018, identificando grupos de transmisión y actualizando los datos de diversidad genética en el país. Además, presentamos una revisión completa de las tendencias de las variantes del VIH-1 durante 43 años (1976-2018) en RDC y Kinshasa. Para ello, analizamos todas las secuencias *pol* del VIH disponibles en LANL y las secuencias generadas en este trabajo a partir de niños, adolescentes y adultos infectados en seguimiento clínico en dos hospitales de Kinshasa durante 2016-2018. Todas las secuencias descargadas de LANL fueron reclasificadas con un nuevo análisis filogenético, incluyendo el subtipo L y los nuevos CRF descritos en los últimos años. Posteriormente estudiamos las tendencias temporales de las variantes del VIH-1 en RDC

y Kinshasa, en ese periodo de 43 años, considerando el año de muestreo de cada secuencia.

En este estudio se partió de toda la cohorte disponible compuesta por DBS de 340 pacientes con infección por VIH en seguimiento clínico en los Hospitales Monkole y Kalembelembe (Kinshasa, RDC). De ellos 71 (20,9%) eran niños (0-14 años) o adolescentes (15-21 años) y 269 (79,1%) adultos (>22 años). Las secuencias obtenidas de todos ellos se depositaron en GenBank con los siguientes números de acceso: MH920378-MH920435, MN530990-MN531082, y MN998509-MN998523.

Este estudio se realizó con la colaboración del grupo del Dr. Gabriel Reina, responsable del Departamento de Microbiología de la Clínica Universidad de Navarra asociado al Instituto de Investigación Sanitaria de Navarra (IdiSNA), y con el grupo del Dr. Juan Carlos Galán, responsable del Departamento de Virología del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal en Madrid.

## RESULTADOS

### **Actualización de la epidemiología molecular del VIH en RDC**

Obtuvimos 165 (48,5%) secuencias virales *pol* (115 PR, 139 RT y 115 IN) del VIH-1 de los 340 DBS tomados de pacientes infectados por VIH en Kinshasa (RDC) durante 2016-2018. De ellas, 55 (33,3%) secuencias eran de niños/adolescentes y 110 (66,7%) de adultos (**Tabla 2.1**). La mediana de edad [RIC] en la recogida de muestras para niños y adultos fue de 14,4 [RIC, 11,4-16,8] y 43 [34-53,5] años, respectivamente. Alrededor del 75% de los sujetos del estudio con secuencia *pol* disponible estaban bajo TAR y 8 de cada 10 presentaron más de 1.000 copias de ARN del VIH-1/ml a toma de muestra (**Tabla 2.1**).



**Tabla 2.1. Principales características de la población infectada por VIH-1 en Kinshasa (RDC) con secuencias disponibles (2016-2018).**

	Niños y Adolescentes (%)	Adultos (%)	Total (%)
<b>Pacientes con secuencias <i>pol</i></b>	55 (33,3)	110 (66,7)	165 (100)
<b>Mujeres</b>	28 (50,9)	64 (58,2)	92 (55,8)
<b>Edad a la toma de DBS (años), mediana [RIC]</b>	14,4 [11,4-16,8]	43 [34-53,5]	32,4 [16,2-48,5]
<b>Exposición al TAR</b>			
<b>ARV <i>naïve</i></b>	0	11 (10)	11 (6,7)
<b>En TAR</b>	55 (100)	69 (62,7)	124 (75,2)
<b>Desconocido</b>	0	30 (27,3)	30 (18,2)
<b>CV &gt; 1000 copias de ARN del VIH-1 (datos conocidos en 55 niños y en 103 adultos)</b>			
<b>En 1 círculo de DBS [rango]</b>	19/55 (34,5) [1.260-16.700]	51/103 (49,5) [1.200-132.000]	70 (42,4) [1.200-132.000]
<b>En 1 ml de plasma*[rango]</b>	49/55 (89,1) [1.351-469.320]	86/103 (83,5) [1.008-3.901.478]	135 (81,8) [1.008-3.901.478]
<b>Secuencias <i>pol</i> de VIH-1 disponibles</b>			
<b>PR</b>	36 (65,5)	79 (71,8)	115 (69,7)
<b>RT</b>	49 (89,1)	90 (81,8)	139 (84,2)
<b>IN</b>	40 (72,7)	75 (68,2)	115 (69,7)
<b>Combinación de secuencias por regiones</b>			
<b>Solo PR</b>	0	1 (0,9)	1 (0,6)
<b>Solo RT</b>	5 (9,1)	8 (7,3)	13 (7,9)
<b>Solo IN</b>	6 (10,9)	19 (17,3)	25 (15,1)
<b>PR+RT</b>	10 (18,2)	26 (23,6)	36 (21,8)
<b>RT+IN</b>	8 (14,5)	4 (3,6)	12 (7,3)
<b>PR+RT+IN</b>	26 (47,3)	52 (47,3)	78 (47,3)
<b>Variantes del VIH-1 en <i>pol</i></b>			
<b>Subtipo B</b>	1 (1,8)	0	1 (0,6)
<b>Subtipos No-B</b>	28 (50,9)	70 (62,4)	98 (59,4)
<b>CRF</b>	2 (3,6)	19 (17)	21 (12,7)
<b>URF</b>	22 (40)	17 (14,5)	39 (23,7)
<b>U</b>	2 (3,6)	4 (3,6)	6 (3,6)

**Leyenda Tabla 2.1.** CV, carga viral; RDC, República Democrática del Congo; DBS, *dried blood spots* o muestras de sangre seca; TAR, tratamiento antirretroviral; ARV, antirretroviral; PR, proteasa; RT, retrotranscriptasa; IN, integrasa; *pol*, región codificante *pol* del VIH-1; CRF, forma recombinante circular; URF, forma recombinante única; U, variante desconocida, no relacionada con los subtipos puros, CRF o URF. \*Copias de ARN del VIH-1 por ml de plasma empleando la técnicas Cobas-CV (Roche) tras corregir los valores obtenidos en un círculo del DBS considerando el hematocrito<sup>196,197</sup>.

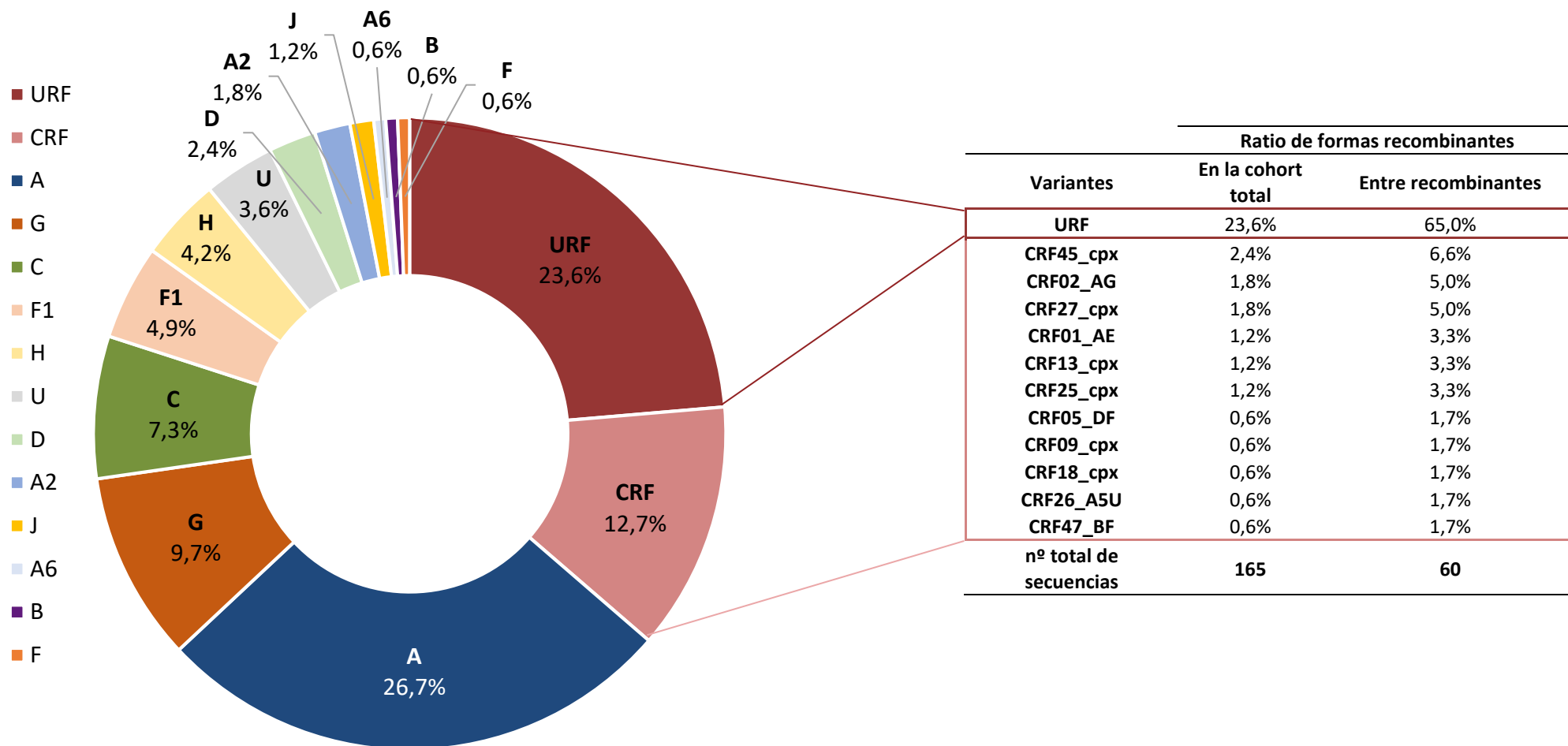
En LANL recuperamos 5.672 secuencias *pol* del grupo M sin ambigüedades, 4.090 de ellas asignadas a subtipos puros de VIH-1 (300 A, 2.476 B, 1.133 C, 72 D, 48 F, 45 G, 7 H, 5 J, 1 K, 3 L) y 1.582 formas recombinantes circulantes CRF\_01 a CRF\_99. Como se esperaba, la mayoría de las secuencias virales (99,4%) de los 165 sujetos se clasificaron como variantes no-B del VIH-1 en la región de codificación *pol*. Entre ellos, el 59,4% eran 9 subtipos puros no-B, 36,4% formas recombinantes (23,7% URF y 12,7% CRF) y 3,6% secuencias únicas no clasificables (U).

La variante del VIH-1 más frecuente fue el subtipo A (26,7%), seguida de los subtipos G (9,7%) y C (7,3%) (**Fig. 2.1** y **Fig. Sup. III.1 - Anexo III**). Los CRF más prevalentes fueron CRF45\_cpx (2,4%), CRF02\_AG (1,8%) y CRF27\_cpx (1,8%) en la cohorte total. Curiosamente, identificamos por primera vez la variante CRF47\_BF en RDC, infectando a una niña de 8 años. Entre las formas recombinantes, los URF representaron el 65% de las infecciones en nuestra cohorte de estudio (2016-2018). Los patrones de recombinación en *pol* de las 39 secuencias clasificados como URF se describen en la **Figura 2.2**. Cuando se compararon variantes específicas de VIH-1 entre grupos de edad, los adultos presentaron un mayor número de CRF diferentes (11 variantes) que el grupo de niños/adolescentes (2 CRF: CRF27\_cpx y CRF47\_BF). Aunque el grupo de niños/adolescentes presentaba menos diversidad, tenía casi 3 veces más infecciones por URF que los adultos (40% frente a 14,5%;  $p < 0,05$ ). La tasa de subtipos puros fue similar en ambos grupos.

#### **Identificación de grupos de transmisión entre adultos y niños/adolescentes no relacionados epidemiológicamente**

Entre las 165 secuencias *pol* de Kinshasa identificamos 4 grupos de transmisión independientes (**Tabla 2.2** y **Fig. Sup. III.2-5 - Anexo III**) respaldados por un 100% de *bootstrap*. Tres de estos grupos de transmisión presentan transmisión reciente (distancia genética inferior a 0,01): grupo 1, grupo 3 y grupo 4. Los individuos infectados de los grupos 1, 2 y 3 portaban secuencias *pol* de subtipo A, aunque no estaban adscritos a subtipos A o CRF caracterizados previamente. Aparecieron en 3 ramas diferentes en árboles PhyML después de haber incluido como referencia todas las secuencias LANL atribuidas al subtipo A y sus sub-subtipos que circulan en RDC desde 1976 (**Fig. Sup. III.2-4, Anexo III**). Los sujetos del grupo 4 albergaban virus de subtipo H, agrupados aparte de otras secuencias de LANL de subtipo H de RDC (**Fig. Sup. III.5 - Anexo II**).

Figura 2.1. Caracterización actual por epidemiología molecular en la cohorte de estudio del VIH-1 de Kinshasa, RDC, con DBS recolectados en 2016-2018.



**Figura 2.2. Estructura de recombinación de las secuencias *pol* disponibles clasificadas como URF, recuperadas de 39 pacientes infectados por VIH-1 en Kinshasa (2016-2018).**

Pacientes	Variantes del VIH	PROTEASA	RETROTRANSCRIPTASA	INTEGRASA
<b>16.CUN13</b>	URF_AU			
<b>16.CUN20</b>	URF_AU			
<b>16.CUN43</b>	URF_AU			
<b>16.CUN49</b>	URF_AU			
16.RDC_P44	URF_AU			
<b>16.CUN64</b>	URF_AU			
18.RDC_P99	URF_AU			
<b>18.CUN374</b>	URF_AU			
<b>16.CUN32</b>	URF_AU			
16.RDC_P13	URF_A1U			
<b>18.CUN291</b>	URF_A1A			
<b>16.CUN102</b>	URF_AC			
18.RDC_P84	URF_A01AE	01AE		
<b>17.CUN123</b>	URF_AH			
<b>16.CUN6</b>	URF_AK			
16.RDC_P5	URF_AG			
<b>17.CUN122</b>	URF_AG			
<b>16.CUN5</b>	URF_AB			
18.RDC_P91	URF_BD			
18.RDC_P95	URF_ABG			
18.RDC_P96	URF_BG			
18.RDC_P98	URF_BG			
18.RDC_P76	URF_BG			
18.RDC_P100	URF_AB			
16.RDC_P7	URF_BG			
16.RDC_P10	URF_ABG			
<b>17.CUN121</b>	URF_BA			
18.RDC_P83	URF_BG			
18.RDC_P89	URF_BG			
<b>16.CUN17</b>	URF_CU			
<b>16.CUN23</b>	URF_AC			
18.RDC_P73	URF_DG			
16.RDC_N37	URF_DF1			
18.RDC_P71	URF_GU			
18.RDC_P86	URF_GU			
<b>16.CUN83</b>	URF_A1G			
18.RDC_P79	URF_AF1G			
16.RDC_P3	URF_HG			
17.RDC_P11	URF_JU			

**Subtipo** A A1 B C D F1 G H J K U **Secuencia no disponible**

**Leyenda Figura 2.2.** Esta figura representa una estructura URF simplificada. En negrita, son los virus recolectados de adultos. El resto, virus tomados de niños o adolescentes.

La **Tabla 2.2** muestra los datos epidemiológicos recopilados de los informes clínicos de cada paciente. Todos los grupos incluían 2 sujetos, excepto el grupo 1, que incluía una mujer de 34,7 años, un niño de 6,2 años y un adolescente de 14,3 años sin relación epidemiológica informada (**Fig. Sup. III.2 - Anexo III**). Los grupos 2 y 3 incluyeron dos adultos y el grupo 4 dos niños.

**Tabla 2.2. Identificación de grupos de transmisión en la cohorte de Kinshasa (2016-2018).**

Grupo	Datos de los pacientes				Datos de los grupos de transmisión				
	Pacientes involucrados	Grupo de edad	Edad a toma DBS (años)	Género	Variante VIH-1	nts analizados	Bootstrap	Distancia genética	Árbol PhyML
1	16.RDC_P33	adolescente	14,3	M	A*	1270	100%	0,02***	Fig. Sup. III.2
	18.RDC_P64	niño	6,2	M					
	18.CUN288	adulto	34,7	F					
2	16.CUN24	adulto	57,7	F	A*	1279	100%	0,05	Fig. Sup III.3
	16.CUN82	adulto	62,3	M					
3	16.CUN28	adulto	50,6	F	A*	649	100%	0,003	Fig. Sup III.4
	16.CUN32	adulto	37,6	F					
4	16.RDC_P3	niño	10,2	M	H	1269	100%	0,005	Fig. Sup II.5
	17.RDC_P49	niño	9,7	F					

**Leyenda Tabla 2.2.** nts, nucleótidos; Fig. Sup., figura suplementaria (ver **Anexo III**); M, masculino; F, femenino. \*secuencias del subtipo A agrupadas en un cluster diferente a cualquiera de los sub-subtipos A o CRF que incluyen A previamente caracterizados en la región de codificación *pol* recuperada de pacientes en RDC con secuencias disponibles en LANL; \*\*consideramos transmisión reciente cuando la distancia genética era inferior a 0,01. \*\*\*distancia genética <0,01 comparando P64 y CUN288.

### Identificación de una red de recombinación con fragmentos recombinantes comunes en virus de niños y adolescentes de Kinshasa

En las 165 nuevas secuencias (2016-2018), encontramos una red de recombinación en la que están implicados 17 virus que comparten un fragmento *pol* y que incluye dos grupos diferentes (RecG y RecB) (**Tabla 2.3 y Fig. Sup. III.6 - Anexo III**). Curiosamente, todos los virus involucrados fueron recolectados de pacientes pediátricos sin vinculación epidemiológica entre ellos, según los informes clínicos. El grupo RecB incluía virus que compartían un fragmento de 599nt en RT (posiciones 2935-3534 en HXB2) asignado al subtipo B, en 8 pacientes de entre 9 y 18 años. El grupo RecG incluyó virus de 9 adolescentes de 10 a 19 años que compartían un fragmento en IN (posiciones 4390-5005 en HXB2) de 615nt asignados al subtipo G (**Tabla 2.3**). Es de destacar que una secuencia *pol* de una adolescente de 19 años (18.RDC\_P83) compartió fragmentos de ambos grupos (**Fig. Sup. III.6 - Anexo III**). Los virus progenitores comunes para los grupos RecG y RecB que usan árboles PhyML no se encontraron en las 2.802 secuencias de LANL en RDC. También observamos un evento de recombinación en la región de codificación

de la proteasa que involucra virus de 2 adultos (subtipo A, CUN131 y subtipo H, CUN127), lo que lleva a que el virus URF\_A infecte a CUN 123 (**Fig. Sup. III.7 - Anexo III**).

**Tabla 2.3. Descripción de la red de recombinación encontrada entre las 165 variantes del VIH circulantes en Kinshasa durante 2016-2018.**

							Subtipo		A	B	D	G	H	U	Secuencia no disponible				
							Nucleótidos en <i>pol</i> (HXB2)												
Red de recombinación	Pacientes	Edad (años)	Género	Año de muestra	Estado VIH de la madre	Variante del VIH-1 en <i>pol</i>	Región	PR	RT		IN								
							Frag.	1	2	3		4							
							2253	2934	3534	3704	4389	5005							
RecB	RDC_P91	12,8	M	2018	positivo	URF_BD													
	RDC_P96	17,5	F	2018	positivo	URF_BG													
	RDC_P95	11,1	M	2018	positivo	URF_ABG													
	RDC_P98	18,6	F	2018	positivo	URF_BG													
	RDC_P76	9,4	F	2018	positivo	URF_BG													
	RDC_P100	17,2	F	2018	positivo	URF_AB													
RecB-G	RDC_P89	14,7	F	2018	negativo	URF_BG													
	RDC_P83	17,1	F	2018	desconocido	URF_BG													
	RDC_P73	19,1	F	2018	negativo	URF_DG													
RecG	RDC_P71	14,8	F	2018	negativo	URF_GU													
	RDC_P5	11,6	F	2016	positivo	URF_AG													
	RDC_P7	16,1	F	2016	desconocido	URF_BG													
	RDC_P10	11,6	F	2016	positivo	URF_ABG													
	RDC_P50	11,7	F	2017	desconocido	G													
	RDC_P35	11,4	M	2016	positivo	G													
	RDC_P3	10,2	M	2016	desconocido	URF_HG													
	RDC_P49	9,7	F	2017	desconocido	H													

Nuestra nueva reclasificación encontró algunas discrepancias en la clasificación de la variante del VIH-1 en 8,8% de las secuencias de RDC de 1976-2012 (198 subtipo A1 y 34 U), que probablemente se habían clasificado erróneamente debido al menor número de secuencias de referencia disponibles anteriormente y a la ausencia de los nuevos subtipos y CRF cuando fueron clasificados. El nuevo análisis de PhyML reveló que 198 (32,9%) de las 602 secuencias designadas originalmente como subtipo A1 en LANL eran, en realidad, otras variantes de VIH-1. Así, 101 de ellas eran subtipo A (51%), 88 CRF02\_AG (44,4%), 3 CRF11\_cpx (1,5%), 3 CRF25\_cpx (1,5%), 1 subtipo A6 (0,5%), 1 subtipo F1 (0,5%) y 1 U (0,5%). Entre las 34 (26,6%) secuencias de 128 U LANL de RDC, 12 resultaron ser subtipo A (35,3%), 4 subtipo F1 (11,8%), 3 subtipo A4 (8,8%), 3 subsubtipo A5 (8,8%), 3 subtipo D (8,8%), 3 CRF18\_cpx (8,8%), 2 subtipo K (5,9%), 1 CRF02\_AG (2,9%), 1 subtipo G (2,9%), 1 subtipo H (2,9%) y 1 (0,5%) subtipo L. Por lo tanto, un tercio (32,9%) del subtipo A1 y una cuarta parte (26,6%) de las secuencias de RDC previamente clasificadas como U en LANL habían sido clasificadas erróneamente.

### **Cambios en la epidemiología molecular del VIH-1 en RDC (1976-2018) y en Kinshasa (1983-2018)**

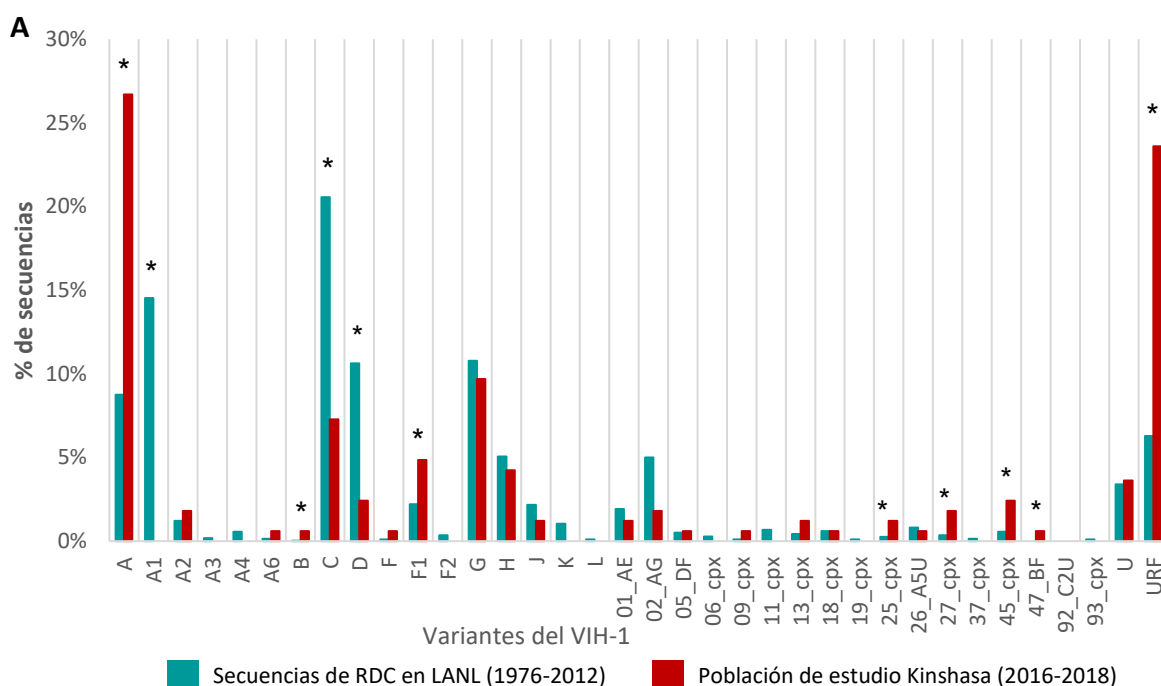
Para analizar la evolución de la epidemiología molecular del VIH-1 a lo largo del tiempo en RDC, comparamos las variantes actuales del VIH-1 en *pol* que circulan en Kinshasa (2016-2018) con las 2.588 secuencias de *pol* reportadas previamente en el país que tenían el año de muestreo conocido (1976-2012) y que habían sido reclasificadas en este estudio. A nivel mundial, se observó una reducción significativa ( $p<0,05$ ) en el porcentaje de subtipos puros y un aumento simultáneo de los URF ( $p<0,05$ ), después de comparar ambos periodos, mientras que la proporción de CRF se mantuvo similar en ambos conjuntos de secuencias (**Fig. 2.3A-B**). La **Figura 2.3C** muestra la evolución de los subtipos puros y las formas recombinantes en RDC a lo largo de la epidemia hasta el 2018.

La distribución de las variantes del VIH-1 cambia mucho entre provincias y no sería correcto comparar la diversidad en Kinshasa con la de todo el país. Por ello, realizamos un nuevo análisis utilizando todas las secuencias *pol* disponibles depositadas en LANL de muestras recogidas en Kinshasa, tras identificar sus números de acceso en los artículos correspondientes, recuperando 181 secuencias *pol* de diferentes sujetos. Así pudimos comparar la distribución temporal de las variantes del VIH-1 en Kinshasa que infectaban

a las 181 muestras recolectadas exclusivamente en la ciudad durante 1983-2008 (94,5% de ellas muestreadas durante 2007-2008) vs. las encontradas en las nuevas 165 secuencias *pol* de este estudio recolectadas durante 2016-2018 en Kinshasa.

Observamos que durante 2016-2018 hubo un aumento significativo en el subtipo A (10,5% vs. 26,7%,  $p<0,05$ ) y el sub-subtipo F1 (0% vs. 4,8%,  $p<0,05$ ), y una reducción significativa en el subtipo A1 (11% vs. 0%,  $p<0,05$ ) y subtipo D (7,7% vs. 2,4%,  $p<0,05$ ) en comparación con las variantes de Kinshasa que circulaban de 1983 a 2008. Sin embargo, la proporción de CRF se mantuvo similar en ambos conjuntos de secuencias (12,1 vs. 13,2%, respectivamente). Además, detectamos la variante CRF47\_BF por primera vez en el país y en la ciudad. Los URF tendieron a disminuir con el tiempo (31% frente a 23,6%), el resto de variantes permanecieron estables (**Fig. 2.3D**).

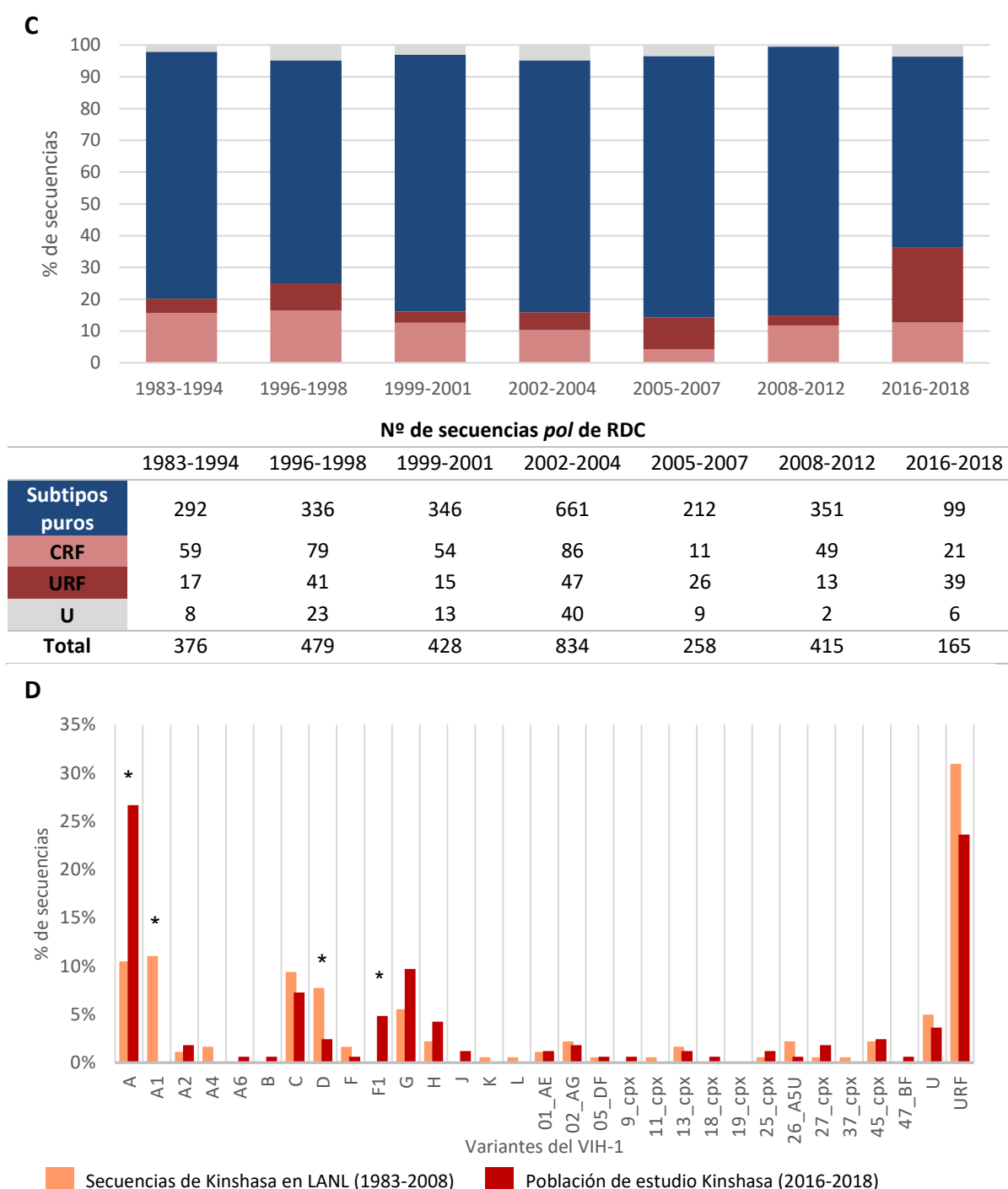
**Figura 2.3. Comparación de las variantes del VIH-1 en la cohorte del estudio (2016-2018) frente a las secuencias LANL de RDC (1976-2012) y Kinshasa (1983-2008).**



**B**

Lugar	LANL	Cohorte de estudio	<i>p</i> -valor
	RDC	Kinshasa (RDC)	
Año de las secuencias	1976-2012	2016-2018	-
<b>Número de secuencias (%)</b>			
Total	2.802 (100)	165 (100)	-
Adultos	2.800 (99,9)	110 (66,7)	<0,05
Niños/adolescentes	2 (0,1)	55 (33,3)	<0,05
<b>Variantes del VIH-1 (PhyML)</b>			
Subtipos puros	2.198 (78,4)	99 (66,1)	<0,05
CRFs	333 (11,9)	21 (12,7)	ns
URFs	176 (6,4)	39 (23,6)	<0,05





**Leyenda Figura 2.3. A.** Comparación de las variantes del VIH-1 en la cohorte del estudio de Kinshasa (2016-2018) frente a las secuencias de RDC disponibles en LANL (1976-2012). **B.** Comparación de datos entre la cohorte de estudio y LANL. **C.** Evolución de los subtipos puros y formas recombinantes en RDC por periodos de tiempo durante 1983-2018. El panel C excluye las secuencias *pol* de RDC muestreada durante 1977-1982, 1986, 1995, 2009, 2010, 2013-2015, debido a su ausencia en la base de datos LANL. Agrupamos todas las secuencias tomadas durante 1983-1994 como un "periodo temprano" para evitar posibles sesgos debido al número no representativo de secuencias *pol* de cada año dentro de ese periodo. Los paneles B y C excluyen 214 secuencias LANL de RDC con un tiempo de muestreo desconocido recopilado antes de 2012. **D.** Comparación de la distribución de variantes de VIH-1 que circulaba en Kinshasa durante 1983-2008 vs. 2016-2018. Para el análisis, utilizamos las 181 secuencias *pol* con el número de acceso disponible en GenBank de las muestras recolectadas en esa ciudad durante 1983-2008

vs. las nuevas 165 secuencias *pol* recolectadas durante 2016-2018 de este estudio. cpx, complejo; CRF, forma recombinante circulante; URF, forma recombinante única. \*, *p*-valor <0,05.

### Diferencias en la diversidad genética entre conjuntos de secuencias *pol* de RDC

La diversidad genética global en las 2.802 secuencias *pol* de LANL (1976-2012) vs. nuestro conjunto de 165 secuencias *pol* (2016-2018) reportó valores similares (0,90 vs. 0,91) (**Tabla 2.4**). Sin embargo, considerando las variantes específicas del VIH-1, el conjunto LANL presentó una mayor diversidad genética en subtipos puros (0,84 vs. 0,76), mientras que la diversidad de los CRF fue mayor desde 2016 (0,78 vs. 0,89). Cuando la diversidad genética se comparó en las secuencias más recientes según el grupo de edad, fue mayor en niños/adolescentes que en adultos (0,92 vs. 0,88), principalmente en las variantes URF (0,93 vs. 0,80), mientras que en los CRF la diversidad fue mayor en adultos que en el grupo de niños/adolescentes (0,88 vs. 0,50) (**Tabla 2.4**).

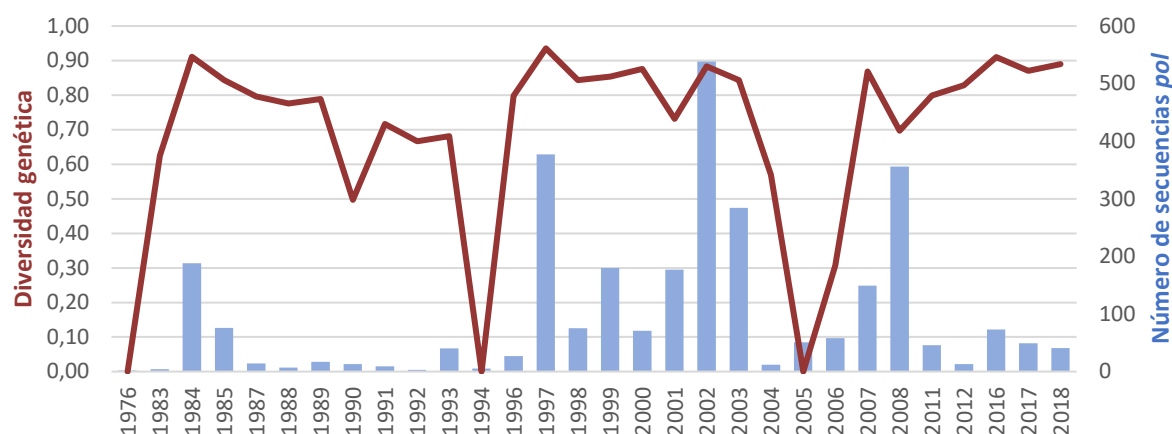
**Tabla 2.4. Diversidad genética por grupos de estudio en secuencias *pol* del VIH-1 de RDC.**

	LANL RDC 1976-2012	Cohorte de estudio Kinshasa 2016-2018		
		Total	Niños/adolescentes	Adultos
<b>Total</b>	0,90 (n=2.802)	0,91 (n=165)	0,92 (n=55)	0,88 (n=110)
<b>Subtipos puros</b>	0,84 (n=2.198)	0,76 (n=99)	0,73 (n=29)	0,75 (n=70)
<b>CRF</b>	0,78 (n=333)	0,89 (n=21)	0,50 (n=2)	0,88 (n=19)
<b>URF</b>	0,95 (n=176)	0,92 (n=39)	0,93 (n=22)	0,80 (n=17)

**Leyenda Tabla 2.4.** CRF, formas recombinantes circulantes; URF, formas recombinantes únicas; n, número de secuencias *pol*; LANL, base de datos de secuencia de VIH de Los Álamos.

La **Figura 2.4** muestra la alta diversidad genética a lo largo del tiempo en las secuencias *pol* muestreadas en RDC desde 1976 (año de la primera secuencia *pol* disponible) hasta 2018, con algunas variaciones por periodos de tiempo.

**Figura 2.4.** Tendencias temporales de la diversidad genética a lo largo de los años en las secuencias *pol* del VIH-1 de RDC.



**Leyenda Figura 2.4.** Barras en azul, secuencias *pol* disponibles de RDC con año de muestreo conocido. La base de datos LANL no incluía secuencias *pol* de RDC muestreada durante 1977-1982, 1986, 1995, 2009, 2010 y 2013-2015.

## DISCUSIÓN

Como ya se ha comentado, RDC es el país donde se originó la pandemia del VIH-1, siendo su capital Kinshasa el epicentro para la selección y propagación de muchas variantes del VIH-1 a los países vecinos<sup>272</sup>. Como consecuencia de la alta heterogenicidad genética del VIH-1 (probablemente la tasa de diversidad más alta del mundo), las reconstrucciones filogenéticas precisas no han sido fáciles de interpretar en este país<sup>273</sup>. Por esta razón, nuestro primer enfoque fue volver a analizar las secuencias de todas las variantes del VIH-1 disponibles depositadas en LANL de RDC. De acuerdo con la nueva clasificación de variantes del VIH-1 y programas filogenéticos utilizados en este trabajo observamos que un 8,8% de secuencias estaban previamente mal clasificadas en LANL.

Los patrones geográficos globales en la distribución de variantes del VIH-1 están cambiando con el tiempo debido a varios factores, como los movimientos de población o las redes de transmisión densas. Estos factores están contribuyendo a una pandemia de VIH-1 impredecible<sup>274,275</sup>. En consecuencia, es necesaria una vigilancia epidemiológica molecular continua y precisa para aumentar nuestro conocimiento sobre la evolución de la epidemia de VIH-1, especialmente en aquellas áreas geográficas con alta tasa de diversidad genética, donde co-circulan múltiples variantes de VIH-

1<sup>276,277</sup>, como ocurre en RDC. En estos entornos, la selección de nuevas formas recombinantes es más fácil y la evolución viral podría ser más rápida que en aquellas regiones con baja diversidad de VIH-1<sup>20</sup>.

Debido a la falta de datos actualizados sobre la epidemiología molecular del VIH en RDC, presentamos la información de 165 secuencias de *pol* obtenidas en poblaciones adultas y pediátricas, que representan los datos más recientes sobre los subtipos circulantes de VIH-1 y las formas recombinantes en Kinshasa en el periodo 2016-2018. También comparamos las tendencias temporales de las variantes del VIH-1 en RDC durante un periodo de 43 años, empleando secuencias disponibles en 28 publicaciones que estaban depositadas en LANL<sup>17,30,89,223–229,272,273,278–293</sup>. En la **Tabla Suplementaria III.1 - Anexo III** se muestra el año de muestreo, el tipo de muestra, la población de estudio, el número de secuencias analizadas, las regiones de codificación, el método de subtipaje y la disposición de las secuencias en bases de datos en cada uno de los 28 estudios con caracterización de variantes del VIH-1 en RDC. Dado que el VIH es propenso a la recombinación durante la retrotranscripción, se esperan altos niveles de formas recombinantes después de coinfecciones o superinfecciones, especialmente en lugares con alta diversidad viral, como en RDC<sup>226,229</sup>. En este escenario, el VIH-1 puede acelerar su adaptación al huésped, favoreciendo variantes emergentes con patogenicidad desconocida<sup>271</sup>.

Estudios previos también han informado de una distribución geográfica heterogénea de las variantes del grupo M entre las regiones de RDC<sup>294</sup>. Sin embargo, las tasas de recombinación del VIH en nuestro estudio y previamente reportadas en el país podrían subestimarse ya que la mayoría de ellas se clasificaron mediante el uso de secuencias genómicas parciales y cortas (**Tabla Sup. III.1 - Anexo III**) y no genomas completos. Por lo tanto, la tasa de recombinantes en RDC podría ser aún mayor si se evalúan más regiones virales. Aunque el impacto biológico y clínico aún no se ha aclarado, cada vez hay más pruebas de que la recombinación ha desempeñado un papel importante en la historia de la pandemia del VIH-1 y en la evolución viral<sup>295</sup>. En nuestro estudio hemos identificado por primera vez la variante CRF47\_BF en África y RDC, una forma recombinante descrita por primera vez en España<sup>296</sup>, sugiriendo una posible importación del subtipo B a RDC.

Este estudio confirmó que el subtipo A es el subtipo más frecuente, ya que ha mantenido una alta tasa de infecciones en RDC durante las últimas tres décadas<sup>297</sup>. Esto explica la alta tasa de URF formados por fragmentos del subtipo A que circulan en Kinshasa. Esta ciudad se ha propuesto como el origen de los subtipos A, G y F1<sup>272</sup>, que son las variantes comunes de VIH-1 encontradas en nuestra serie. También en Kinshasa surgió el subtipo D, asociado a una progresión más rápida de la enfermedad<sup>42</sup>, pero su prevalencia disminuyó en la ciudad durante 2016-2018 en comparación con años anteriores. Por otro lado, aunque se informó de un aumento significativo del subtipo C entre 1997 y 2002 en Kinshasa<sup>284</sup>, en otros países cercanos a RDC<sup>298</sup> y en todo el mundo<sup>264</sup>, nuestros resultados revelaron una prevalencia similar de esta variante en Kinshasa tras comparar los dos periodos de tiempo de este estudio (1983-2008 y 2016-2018). Se desconocen los motivos de estos hallazgos.

También encontramos que casi 4 de cada 10 variantes que circulan en Kinshasa durante ambos periodos llevaban secuencias recombinantes en *pol*. Así, cuando se analizaron las diversidades de CRF y URF según la edad de los pacientes, la diversidad de CRF en *pol* fue mayor en adultos y la diversidad de URF fue mayor en niños/adolescentes en el último periodo. Las tendencias de la diversidad genética del VIH-1 deberían explorarse más en los próximos años, incluyendo también otros genes del VIH-1. Las altas discrepancias en las secuencias del subtipo A y U *pol* de RDC depositadas en LANL y nuestro re-análisis, revelan la necesidad de revisar y reclasificar por filogenia los datos de epidemiología molecular publicados en el país con secuencias de referencia actualizadas y las nuevas variantes de VIH-1 descritas en los últimos años.

Los enfoques filogenéticos y el análisis basado en la distancia genética entre secuencias virales representan la estrategia más común para identificar redes de transmisión recientes<sup>299</sup>. Ello podría ser útil para identificar otras personas infectadas y no infectadas por VIH con mayor riesgo de transmisión, que podrían beneficiarse de las intervenciones de prevención del VIH<sup>300</sup>. Algunos informes han demostrado que los umbrales de distancia genética de entre 0,01 y 0,02 sustituciones por sitio se han asociado más fuertemente con probables compañeros de transmisión que las conexiones epidemiológicas tradicionales<sup>203,301</sup>, y que una distancia de 0,015 podría servir como un indicador de la relación epidemiológica en un entorno de vigilancia<sup>204</sup>.

Nuestro estudio identificó que 3 de las 4 redes de transmisión eran recientes (umbrales de distancia genética 0,01-0,02).

Por otro lado, implementamos una estrategia basada en la trazabilidad de fragmentos genéticos, para conocer la relación potencial entre las personas infectadas (**Fig. Sup. III.6 - Anexo III**). Esta estrategia de "red de recombinación", nos permitió identificar una red densa y nos proporcionó una visión más completa de las relaciones entre virus de nuestra cohorte de estudio. La red de recombinación encontrada, que involucra secuencias de *pol* de 17 niños y adolescentes sin vínculo epidemiológico, confirmó el importante papel de la recombinación en una pandemia de VIH y la importancia de la identificación de virus ancestros comunes para comprender el origen y la propagación de la recombinación. Los niños están sobrerrepresentados en esta red, por lo que sospechamos que esta red podría ser aún más densa.

Este estudio tiene algunas limitaciones que deben considerarse. En primer lugar, se recogieron muestras de 2016-2018 en dos hospitales de referencia en Kinshasa, lo que no garantiza que la población sea completamente representativa de la población total infectada y, menos aún, a nivel de todo el país<sup>294</sup>. Sin embargo, la inclusión de todas las secuencias *pol* de LANL recopiladas en el país y en la ciudad durante más de 4 décadas proporciona una buena visión general de la gran diversidad del VIH-1 en RDC. Una segunda limitación sería la longitud de las secuencias *pol* recuperadas, que además diferían entre las muestras analizadas, lo que complica el análisis bioinformático. Otra limitación es que algunos estudios previos en RDC no subieron sus secuencias a las bases de datos del VIH y no estaban disponibles en LANL (**Tabla Sup. III.1 - Anexo III**). Por lo tanto, estas variantes de VIH-1 no pudieron ser reevaluadas mediante un nuevo análisis PhyML e incluirse en el análisis temporal de las variantes de VIH-1. Por ello, destacamos la necesidad de proporcionar el número de acceso de las secuencias de todos los estudios de epidemiología del VIH del mundo, antes de la publicación de los artículos, y la inclusión del año de muestreo en todas las secuencias enviadas.

En las secuencias de RDC disponibles en LANL, el año de muestreo estaba ausente en 214 (8%) de las secuencias *pol*. La falta de pruebas de resistencia en la rutina durante el seguimiento clínico de sujetos infectados por VIH en RDC limita la disponibilidad de secuencias *pol* en el país. Además, la falta de información epidemiológica completa de

los sujetos involucrados en los análisis no permite comprender totalmente el origen de un grupo de transmisión o recombinación. Finalmente, no fuimos capaces de amplificar *pol* en el 51,5% de los DBS, por lo que no pudimos obtener ninguna secuencia viral de esas muestras. Esto se debió, posiblemente, a la baja carga viral (40-1000 copias de ARN del VIH-1/círculo del DBS) observada en más de la mitad de las muestras y al bajo volumen de plasma en los 2 círculos de DBS utilizados para extracción de ARN, lo que limita la capacidad de obtener amplificaciones positivas de PCR del VIH en estas muestras. Además, podría ocurrir que alguna de las muestras, que no se pudieron amplificar, tuviera mutaciones en las regiones virales de unión a los cebadores empleados en las PCR realizadas debido a la alta variabilidad genética del virus. Ello no sería improbable si tenemos en cuenta la gran frecuencia de recombinantes únicos con estructura genética compleja encontrados en este país. Por tanto, no podemos descartar que los cebadores universales diseñados por la OMS para las amplificaciones realizadas en este estudio pudieran tener limitaciones a la hora de amplificar algunas nuevas variantes que actualmente circulan en RDC.

Dado que ninguna de las secuencias descargadas de LANL se muestreó después de 2012, se puede considerar que nuestro conjunto de secuencias de RDC es el más reciente publicado hasta la fecha y el más alto en número de secuencias *pol* analizadas de Kinshasa. Nuestro estudio refuerza el uso de sangre seca como un tipo de muestra útil y alternativa a la sangre entera o plasma en estudios de vigilancia epidemiológica molecular del VIH en países en desarrollo o entornos con limitaciones en cuanto a la recolección, almacenamiento, transporte de sangre o cuando hay bajo volumen disponible<sup>85</sup>. Solo 3 de los 28 estudios de epidemiología molecular en RDC<sup>30,89,292</sup> habían usado DBS para la caracterización de la variante del VIH-1 (**Tabla Sup. III.1 - Anexo III**). Aunque dos estudios anteriores publicaron el genoma completo del VIH-1 de un bebé<sup>279</sup> de 12 meses infectado verticalmente y las secuencias de los virus que infectaron a 15 niños en Kimpese, RDC<sup>278</sup>, nuestro estudio presenta los datos más extensos sobre niños infectados por VIH y adolescentes en el país. La alta diversidad genética observada en RDC también representa un verdadero desafío para el futuro desarrollo de vacunas, la eficacia de los TAR, el diagnóstico y las pruebas de monitoreo de infección por VIH<sup>302</sup>.

En conclusión, en este estudio informamos de los datos más recientes de las variantes de VIH-1 que circulan en Kinshasa, el origen geográfico de la pandemia, y proporcionamos una información única y actualizada sobre las tendencias temporales de los subtipos del VIH-1, CRF y URF en RDC durante un periodo de 43 años (1976-2018) y en Kinshasa de 1983-2018, después de la reclasificación de las secuencias LANL disponibles utilizando el análisis filogenético. Los datos proporcionados aumentan y actualizan el conocimiento de la epidemiología molecular del VIH en RDC. Se detectaron grupos de transmisión activos, y una nueva estrategia que nos ofrece una visión más completa de las redes de transmisión. Es preocupante que se haya observado una sobrerrepresentación de niños en la red de recombinación. La vigilancia molecular continua será esencial para determinar y rastrear formas recombinantes únicas raras o cepas emergentes de VIH en el país.

### **DIVULGACIÓN**

El trabajo descrito en este capítulo fue publicado como artículo de investigación, incluido en el **Anexo V**:

Rubio-Garrido M., González-Alba J.M., Reina G., Ndarabu A., Barquín D., Carlos S., Galán J.C., Holguín A. Current and historic HIV-1 molecular epidemiology in paediatric and adult population from Kinshasa, the Democratic Republic of Congo. *Scientific Reports* **9**, 5679 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41963-y>. Factor de impacto: 4,122 (Q1).

Fue presentado como póster en los siguientes congresos:

- Póster nº PEA0005 en 23rd International AIDS Conference 2020 (San Francisco/online, EEUU). Rubio-Garrido M., González J.M., Reina G., Ndarabu A., Barquín D., Carlos S., Galán J.C., Holguín, A. *Is something changing in the molecular epidemic of HIV-1 in Kinshasa, in the Democratic Republic of Congo?*
- Póster nº P-212 en XI Congreso Nacional GeSIDA 2019 (Toledo, España). Rubio-Garrido M., González J.M., Reina G., Ndarabu A., Barquín D., Carlos S., Galán J.C.,



Holguín A. *Molecular epidemiology of HIV-1 in children from Kinshasa, Democratic Republic of Congo.*

- Póster nº P-206 en X Congreso Nacional GeSIDA 2018 (Madrid, España). Rubio-Garrido M., Ndarabu A., Reina G., Barquín D., Gutierrez M., Carlos S., Fernández-Alonso M., Holguín A. *Evaluation of webs for rapid subtyping in complex HIV-1 variants from Kinshasa, Democratic Republic of Congo.*

En 2020 se publicó en diversos medios de comunicación escrita a nivel nacional, algunos ejemplos son:

- Ciber-ISCIH: <https://www.ciberisciii.es/noticias/realizado-el-mayor-estudio-sobre-las-variantes-de-vih-1-en-la-zona-cero-de-la-pandemia-del-sida-en-la-republica-democratica-del-congo>
- La Razón: <https://www.larazon.es/sociedad/20201130/cvked6d5vjapthndwnhgtcif6y.html>
- Cope: [https://www.cope.es/actualidad/sociedad/noticias/investigadores-espanoles-publican-estudio-mas-completo-sobre-variantes-del-vih-1-del-congo-20201118\\_1003896](https://www.cope.es/actualidad/sociedad/noticias/investigadores-espanoles-publican-estudio-mas-completo-sobre-variantes-del-vih-1-del-congo-20201118_1003896)

# Capítulo 3

**Los altos niveles de  
resistencia a los ARV  
comprometen el control  
del VIH en población  
pediátrica y adolescente  
en Kinshasa, RDC**

## JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

En los últimos años, el aumento y generalización del TAR frente al VIH ha tenido un gran impacto en la calidad de vida de los pacientes, ha evitado muertes relacionadas con el sida, previniendo nuevas infecciones y ahorrando costes derivados de las complicaciones que puede presentar la infección si no se controla<sup>303</sup>. Sin embargo, a pesar de los avances significativos en la prevención y el tratamiento del VIH, algunos países continúan experimentando problemas en la prestación de servicios de TAR. Ello incluye la falta de medicamentos, el acceso limitado o inexistente de la cuantificación de la CV y la adherencia inadecuada al TAR, que facilitan la aparición y transmisión de mutaciones resistencias (MDR) a los ARV frente al VIH<sup>304</sup>. A medida que continúan los esfuerzos y más personas reciben ARV para el tratamiento o la prevención del VIH, es probable que haya un aumento en los niveles de MDR. Ello puede provocar una propagación de virus resistentes que comprometan los avances logrados en la lucha contra el VIH<sup>142</sup> y los objetivos 95-95-95 de ONUSIDA en varios países para el 2030, principalmente en aquellos lugares donde no hay un seguimiento de la CV ni de las MDR<sup>305</sup>. En esos entornos los pacientes pueden pasar meses, o incluso años, en fallo virológico, lo que favorece la acumulación de MDR y una mayor tasa de morbilidad y mortalidad<sup>306–309</sup>. Por todo esto, el Programa Conjunto de ONUSIDA y la OMS refuerza la importancia de la vigilancia de MDR para controlar la epidemia del VIH<sup>142,310,311</sup>, principalmente en poblaciones clave como los neonatos y adolescentes. Los niños y adolescentes son muy vulnerables a la infección por VIH, principalmente aquellos que viven en entornos con alta prevalencia de VIH<sup>312</sup>. La OMS estima que una séptima parte de las nuevas infecciones por VIH ocurren durante la adolescencia<sup>313</sup>.

Por todas estas razones, el objetivo de este estudio fue analizar la prevalencia de MDR y su impacto terapéutico en 34 niños y 37 adolescentes infectados por VIH y en seguimiento clínico en Kinshasa, RDC. Resulta importante conocer la situación actual de la población pediátrica y adolescente en RDC, al ser pacientes con un tratamiento de por vida con más años bajo TAR que los adultos.

Las secuencias correspondientes a estos pacientes tienen los siguientes números de acceso en GenBank: MH920378-MH920389, MN530990-MN530996, MN531052-MN531082 y MN998519-MN998523.

## RESULTADOS

### Población de estudio

Para este estudio se emplearon muestras de DBS tomadas entre 2016 y 2018 de 71 pacientes seropositivos (34 niños, 37 adolescentes) en seguimiento en unidades pediátricas del VIH de los hospitales Monkole y Kalembelembe. Las secuencias de VIH-1 se pudieron obtener de 55 (77,5%) pacientes en, al menos, una región del genotipo de *pol* para el análisis de las MDR. Estas 55 muestras mostraron una CV media de 11.824 cp/ml [RIC: 2.950-59.578] (**Tabla 3.1**).

La **Tabla 3.1** describe las características principales de la población de estudio. La mediana de la edad en el momento del diagnóstico/primer TAR de los 55 sujetos con secuencia fue de 6 [RIC: 2-12]/7 [RIC: 3,5-12] años. La mediana de la edad a fecha de inscripción al estudio fue de 14 [RIC: 11-16] años. Todos estaban bajo TAR en el momento del muestreo y habían recibido ITIAN e ITINAN. Un 9,1% de ellos tenía experiencia a IP y solo un paciente (1,8%) recibió INI. A pesar de estar bajo TAR una media de 6 [RIC: 1-8,5] años, el 89,1% de los pacientes presentaron viremias superiores a 1.000 cp/ml en el muestreo, lo que sugería que esos pacientes estaban en fallo virológico, ya que todos ellos estaban en TAR.

Los 55 participantes con secuencia viral disponible estaban bajo el primer (34,5%), segundo (30,9%) o tercer (23,6%) régimen de TAR en el momento de muestreo. Seis (10,9%) pacientes habían recibido 4, 5 o 7 regímenes diferentes de ARV. El régimen más común fue AZT/3TC con NVP (81,8%) o EFV (16,4%), seguido de TDF/3TC/EFV (63,6%). Todos los sujetos tenían experiencia con 3TC, seguidos de AZT (85,5%), NVP (83,6%), TDF (65,5%) y EFV (65,5%). Aunque los niños y adolescentes en estudio habían estado expuestos al TAR durante una mediana de 6 años, el número de niños bajo el primer régimen ARV fue significativamente mayor que en adolescentes (48,1% vs. 24,4%,  $p < 0,05$ ). Los adolescentes presentaron un retraso significativamente mayor en el diagnóstico de VIH y en el primer TAR. Además, los adolescentes mostraron una mayor exposición a una serie de medicamentos (TDF, D4T, EFV) en comparación con los niños (**Tabla 3.1**).

Con respecto a las variantes del VIH-1, el 52,8% de los pacientes estaban infectados por subtipos puros del VIH-1 en *pol* (13 A, 1 A2, 1 B, 3 C, 1 D, 1 F1, 6 G, 2 H, 1 J) y el 43,6%

de recombinantes, siendo principalmente URF (40%) y solo 2 CRF. Las variantes restantes fueron clasificadas como no clasificables (U) (Tabla 3.1).

**Tabla 3.1. Características demográficas y virológicas de niños y adolescentes de la cohorte de estudio con secuencias de VIH disponibles.**

	Niños [0-14] (%)	Adolescentes [15-21] (%)	p-valor	Cohorte total (%)
<b>Secuencias totales disponibles</b>	27 (100)	28 (100)		55 (100)
<b>Mujeres</b>	12 (44,4)	17 (60,7)		29 (52,7)
<b>Edad, mediana (años)</b>				
<b>Al diagnóstico en RDC [RIC]</b>	4 [1-8]	10,5 [5,3-13]	**	6 [2-12]
<b>En la primera experiencia al TAR [RIC]</b>	4 [0,8-8]	12 [7-13]	**	7 [3,5-12]
<b>A toma del DBS [RIC]</b>	11 [9-12]	16 [15-17]	**	14 [11-16]
<b>Estado VIH de las madres</b>				
<b>VIH+</b>	12 (44,4)	7 (25)		19 (34,6)
<b>VIH-</b>	2 (7,4)	5 (17,9)		7 (12,7)
<b>Desconocido</b>	13 (48,2)	16 (57,1)		29 (52,7)
<b>Carga viral del VIH-1</b>				
<b>&gt;1.000 cp/ml por Roche-CV</b>	25 (92,6)	24 (85,7)		49 (89,1)
<b>Exposición a TAR</b>				
<b>TAR</b>	27 (100)	28 (100)		55 (100)
<b>Mediana de tiempo en TAR [RIC]</b>	6 [1-8]	6 [1,3-10]		6 [1-8,5]
<b>Tiempo medio de exposición a ARV (años)</b>				
<b>A ITIAN</b>	5,2 (0-12,2)	6,2 (0-13,3)		5,8 (0-13,3)
<b>A ITINAN</b>	4,6 (0-11,2)	6,2 (0-13,3)		5,4 (0-13,3)
<b>A IP</b>	0,9 (0-12,2)	0,26 (0-3,4)		0,6 (0-12,2)
<b>A INI</b>	0	0,09 (0-2,7)		0,05 (0-2,7)
<b>Nº de regímenes de TAR diferentes hasta la toma de muestra</b>				
<b>1</b>	13 (48,1)	6 (21,4)	*	19 (34,5)
<b>2</b>	7 (25,9)	10 (35,7)		17 (30,9)
<b>3</b>	5 (18,5)	8 (28,6)		13 (23,6)
<b>4</b>	1 (3,7)	1 (3,6)		2 (3,6)
<b>5</b>	1 (3,7)	2 (7,1)		3 (5,5)
<b>7</b>	0	1 (3,6)		1 (1,8)
<b>Experiencia a ITIAN</b>				
<b>3TC</b>	27 (100)	28 (100)		55 (100)
<b>AZT</b>	21 (77,8)	26 (92,9)		47 (85,5)
<b>TDF</b>	13 (48,1)	23 (82,1)	*	36 (65,5)
<b>DDI</b>	1 (3,7)	0		1 (1,8)
<b>ABC</b>	5 (18,5)	2 (7,1)		7 (12,7)
<b>D4T</b>	0	4 (14,3)	*	4 (7,3)
<b>Experiencia a ITINAN</b>				
<b>NVP</b>	21 (77,8)	25 (89,3)		46 (83,6)
<b>EFV</b>	13 (48,1)	23 (82,1)	*	36 (65,5)
<b>Experiencia a IP</b>				
<b>LPV/r</b>	3 (11,1)	2 (7,1)		5 (9,1)
<b>Experiencia a INI</b>				
<b>DTG</b>	0	1 (3,4)		1 (1,8)
<b>Pacientes VIH+ con secuencias <i>pol</i> disponibles</b>				
<b>PR</b>	18 (66,7)	18 (64,3)		36 (65,5)
<b>RT</b>	23 (85,2)	26 (92,9)		49 (89,1)

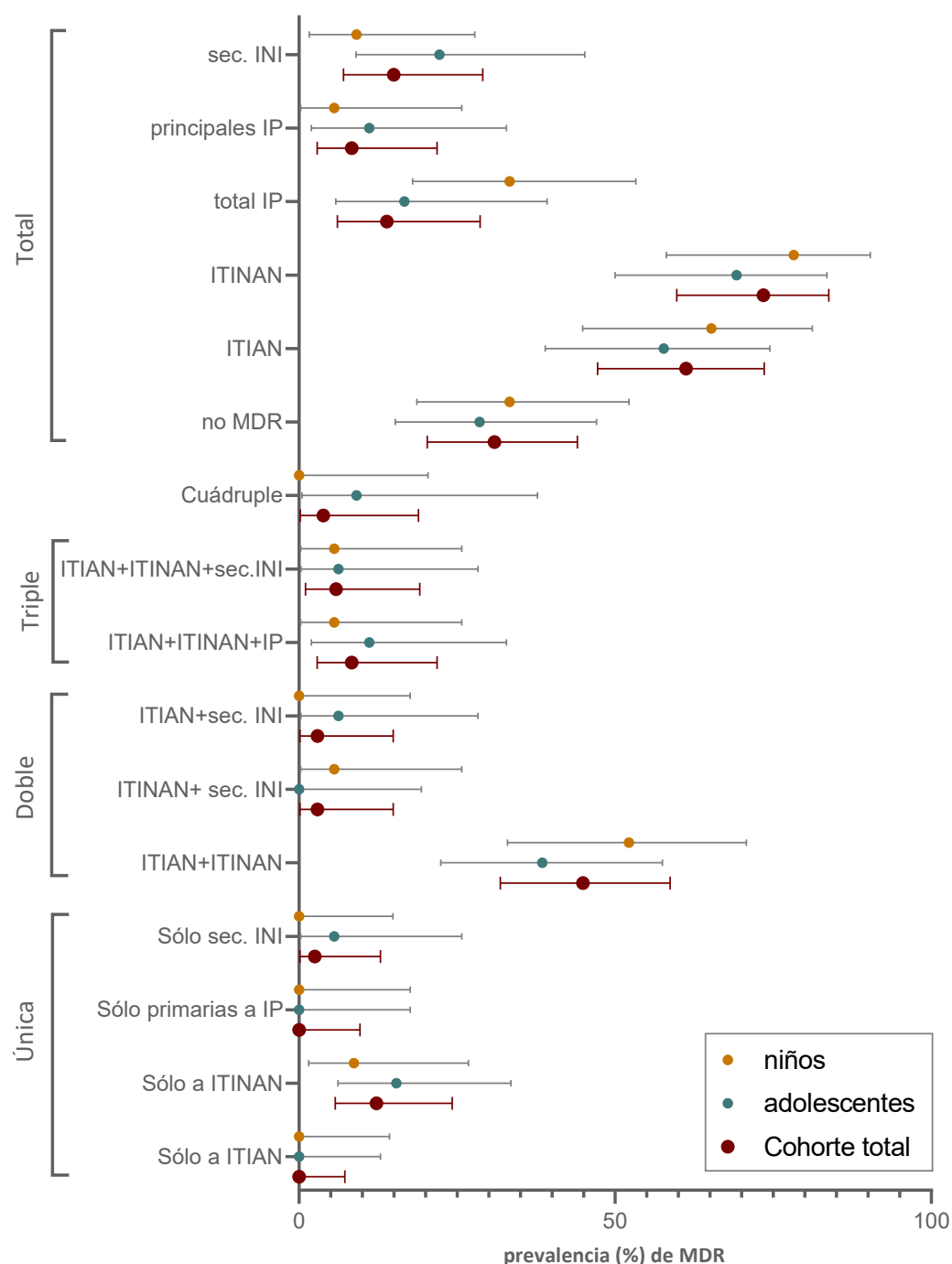
	IN	22 (81,5)	18 (64,3)	40 (72,7)
<b>Variantes del VIH-1</b>				
<b>Subtipos puros no-B</b>		15 (55,6)	14 (50)	29 (52,8)
<b>CRF</b>		1 (3,7)	1 (3,6)	2 (3,6)
<b>URF</b>		9 (33,3)	13 (46,4)	22 (40)
<b>U</b>		2 (7,4)	0	2 (3,6)

**Leyenda Tabla 3.1.** Datos de acuerdo a las fichas clínicas. RDC, República Democrática del Congo; DBS, *dried blood spots* o muestras de sangre seca; TAR, tratamiento antirretroviral; ITIAN, inhibidores de la retrotranscriptasa análogos de nucleós(t)idos; ITINAN, inhibidores de la retrotranscriptasa no análogos de nucleós(t)idos; IP, inhibidores de la proteasa; INI, inhibidores de la integrasa; RIC; rango intercuartílico; CV, carga viral; ARV, fármacos antirretrovirales; 3TC, Lamivudina; AZT, Zidovudina; TDF, Tenofovir; DDI, Didanosina; ABC, Abacavir; D4T, Estavudina; NVP, Nevirapina; EFV, Efavirez; LVP/r, Lopinavir/Ritonavir; DTG, Dolutegravir; PR, proteasa; RT, retrotranscriptasa; IN, integrasa; CRF, formas recombinantes circulantes; URF, formas recombinantes únicas; U, variantes inclasificables.\*\*,  $p < 0,001$ ; \*,  $p < 0,05$ . CV cuantificada por Roche Cobas v2.0, límite de cuantificación  $< 20$  cp/ml. cp/ml, copias de ARN del VIH-1 por mililitro corregido considerando el hematocrito<sup>196</sup>.

### Alta tasa de MDR entre niños y adolescentes con VIH bajo TAR en RDC

La **Figura 3.1** muestra las MDR a los fármacos de las principales familias de ARV encontradas en la cohorte de estudio. Entre los 55 niños y adolescentes con secuencias *pol* disponibles, 37 (67,3%) estaban infectados con virus que llevaban MDR principales a una (12,7%), dos (47,3%) o tres (5,5%) familias de ARV, sin encontrar diferencias significativas entre el grupo de los niños y el de los adolescentes. Solo un tercio (32,7%) de la cohorte estudiada no presentó MDR principales a toma de muestra, a pesar de tener fracaso virológico (carga viral no suprimida,  $< 1.000$  cp/ml) en el 89,1% de ellos. Al considerar también las MDR secundarias para IP e INI, encontramos que 38 (69,1%) pacientes portaban virus con MDR a una (12,7%), dos (43,6%), tres (10,9%) o cuatro (1,8%) familias de ARV (**Figura 3.1** y **Tabla Sup. IV.1 - Anexo IV**).

**Figura 3.1. Tasa de pacientes infectados por VIH con MDR a las principales familias de ARV en la población de estudio.**



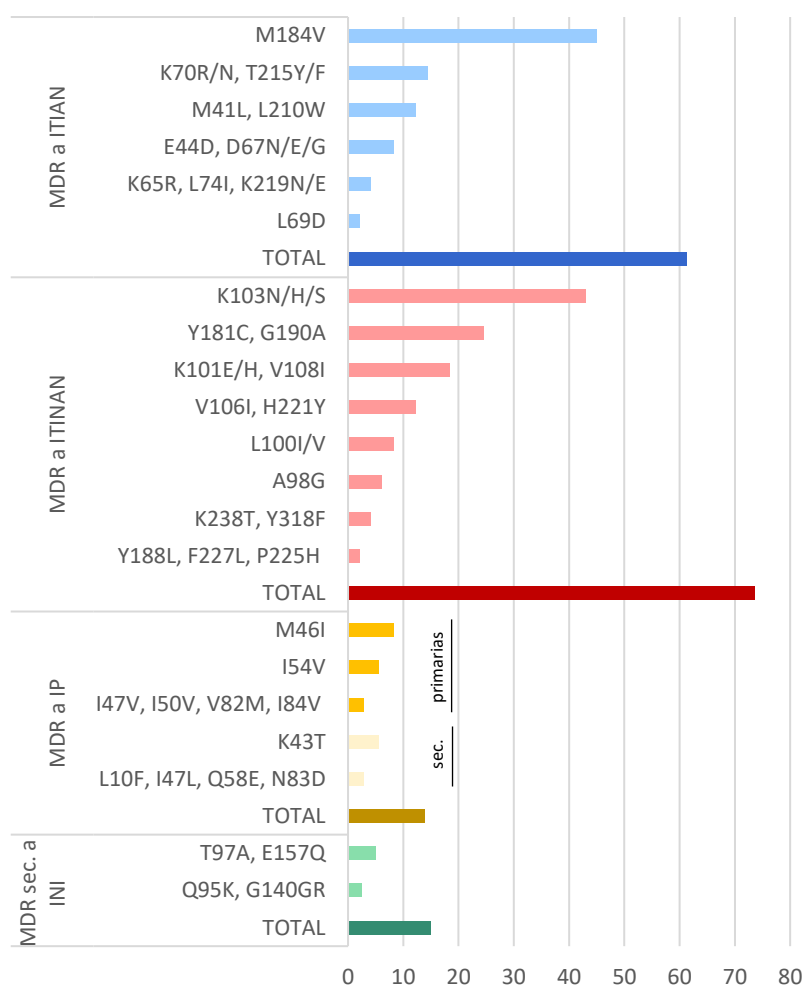
**Leyenda Figura 3.1.** Prevalencia media de MDR (puntos coloreados) a las familias de ARV. Se indican los intervalos de confianza del 95% en la cohorte del estudio con secuencia disponible por edad, que indica que el valor poblacional se encuentra en un determinado rango de valores con un 95% de certeza. Resistencia única, a una familia de ARV; resistencia doble, triple o cuádruple, a fármacos de 2, 3 o 4 familias de ARV; MDR a IP son siempre primarias, salvo que se indique lo contrario. MDR a INI son siempre secundarias (sec INI). ARV, fármacos antirretrovirales; ITIAN, inhibidores de la retrotranscriptasa análogos de nucleós(t)ido; ITINAN, inhibidores de la retrotranscriptasa no análogo de nucleós(t)ido; IP, inhibidores de la proteasa; INI, inhibidores de la integrasa. Tasas calculadas considerando las 55 secuencias disponibles informadas en la **Tabla 3.1**. Más datos disponibles en la **Tabla Sup. IV.1 - Anexo IV**.



De las 36/49/40 muestras secuenciadas con éxito de PR/RT/IN, las MDR a ITIAN estuvieron presentes en un 73,5% [IC 95%, 59,7-83,8] de ellas, MDR a ITIAN en el 61,2% [IC 95%, 47,2-73,6], MDR principales a IP en el 8,3% [IC 95%, 2,8-21,8] y MDR secundarias a INI en el 15% [IC 95%, 7,1 -29,1]. Las resistencias dobles a ITIAN e ITINAN aparecieron en los virus del 44,9% [IC 95%, 31,9-58,7] de los pacientes (**Tabla Sup. IV.1 - Anexo IV**), y todos los que albergaban MDR a ITIAN también contenían MDR a ITINAN. Solo un adolescente de 15,5 años de edad con 13,3 años de experiencia a TAR estaba infectado con virus que tenía MDR a las 4 familias de ARV, aunque con MDR secundaria a INI.

La **Figura 3.2** y la **Tabla Suplementaria IV.2 - Anexo IV** muestran las MDR encontradas en la población de estudio. Las MDR a ITIAN fueron muy prevalentes, al estar presentes en el 61,2% de los pacientes destacando en su RT la M184V (44,9%), K70R/N y T215Y/F (14,3% cada una), M41L y L210W (12,2% cada una). Las MDR a ITINAN estaban en el 73,5% de la cohorte: K103N/H/S (42,9%), Y181C y G190A (24,5% cada una), V108I y K101E/H (18,4% cada una) y H221Y y V106I (12,2% cada una) en la RT viral. Los tres pacientes con MDR principales a IP llevaban M46I (8,3%) en su PR y dos también tenían I54V, y solo uno de ellos tenía experiencia previa a IP. Se encontraron MDR secundarias a INI en el 15% de los sujetos con secuencias IN disponibles, siendo el 9,1% niños y el 22,2% adolescentes. No se observaron diferencias significativas al comparar la tasa de infecciones con virus resistentes portadores de MDR primarias en niños (0-14 años) vs. adolescentes (15-21 años) del estudio (**Tabla Sup. IV.1 - Anexo IV**). Es de destacar que ninguna de las MDR principales identificadas en la población, fueron polimorfismos naturales o marcadores naturales específicos de la variante asociados a resistencias a fármacos.

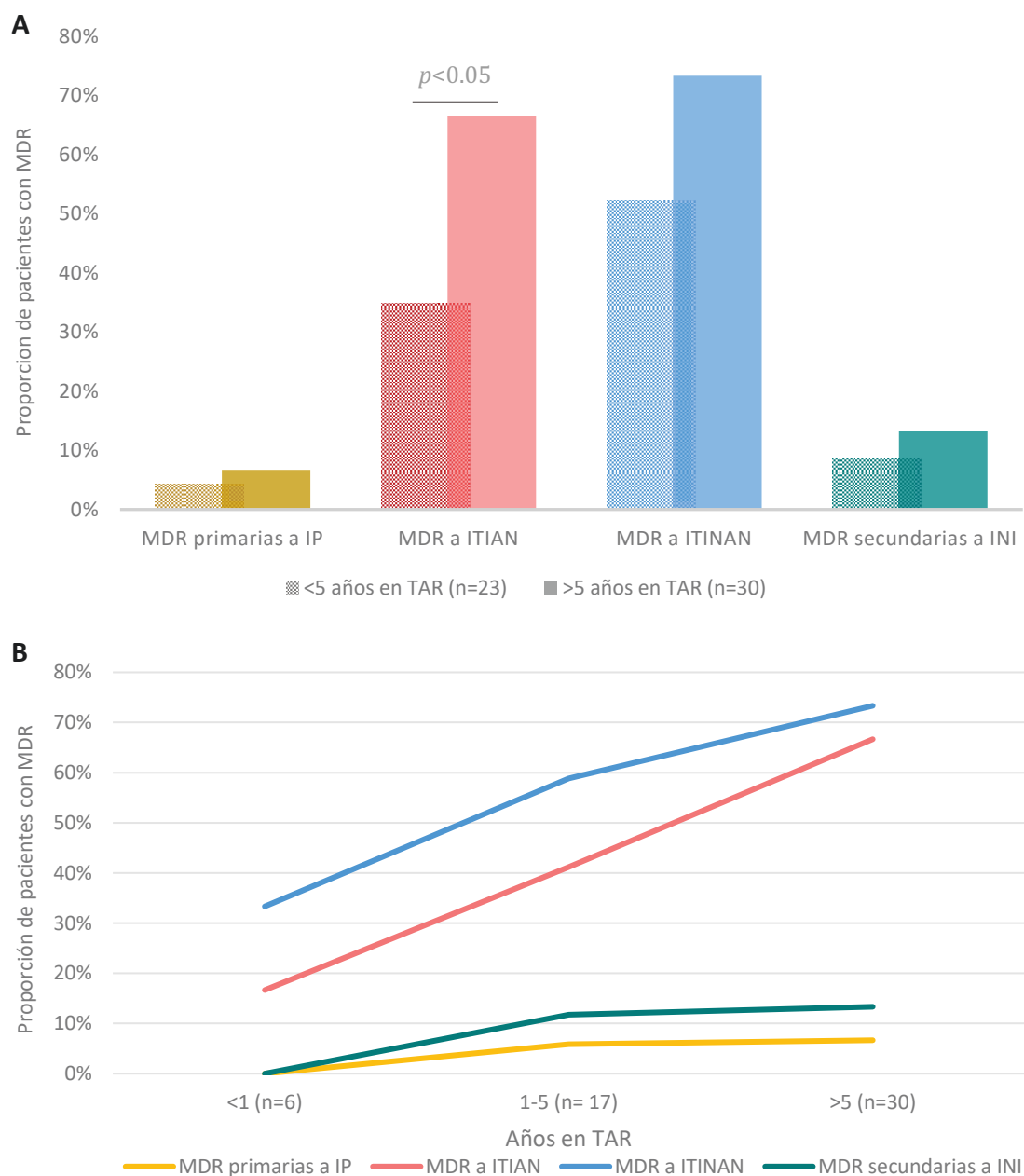
**Figura 3.2. Mutaciones de resistencia en las principales familias de fármacos antirretrovirales en la población de estudio.**



**Leyenda Figura 3.2.** MDR, mutaciones de resistencia; ITIAN, inhibidores de la retrotranscriptasa análogos de nucleós(t)idos; ITINAN, inhibidores de la retrotranscriptasa no análogo de nucleós(t)ido; IP, inhibidores de la proteasa; INI, inhibidores de la integrasa; sec., secundarias. Secuencias disponibles de los 55 pacientes del estudio: 38PR, 49RT y 40 IN. No se encontraron MDR a INI primarias en la cohorte de estudio. Más información disponible en **Tabla Suplementaria IV.2 - Anexo IV**.

Las infecciones con virus resistentes se asociaron con el tiempo de exposición a TAR. Las MDR para todas las familias de ARV fueron más altas en aquellos pacientes que habían recibido TAR durante más de 5 años (**Fig. 3.3A**). La tasa de niños y adolescentes infectados por virus resistentes a ITIAN fue dos veces mayor en aquellos que estuvieron bajo TAR durante más de 5 años (OR = 3,75; IC 95% [1,22-11,34],  $p < 0,05$ ) (**Fig. 3.3A**). Como podemos ver en la **Figura 3.3B**, las infecciones con virus resistentes tendieron a aumentar constantemente con el tiempo de exposición al TAR.

**Figura 3.3. Pacientes VIH infectados portadores de MDR (A) y tendencias (B) según el tiempo de exposición al TAR en la población de estudio.**

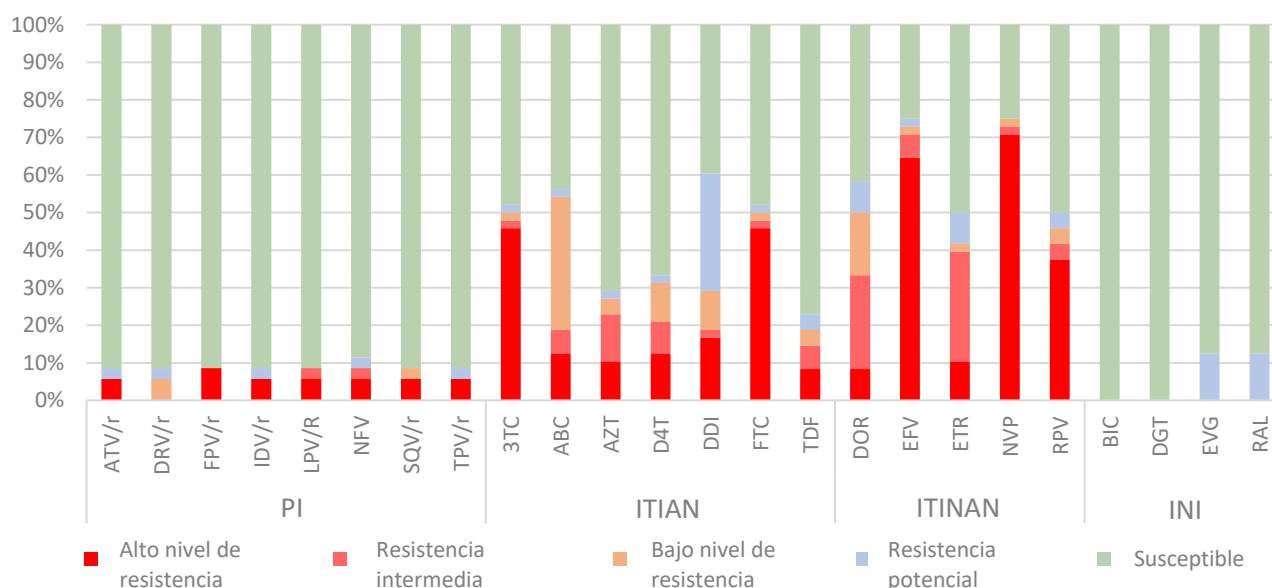


**Leyenda Figura 3.3.** MDR, mutaciones de resistencia; TAR, tratamiento antirretroviral; ITIAN, inhibidores de la retrotranscriptasa análogos de nucleós(t)idos; ITINAN, inhibidores de la retrotranscriptasa no análogos de nucleós(t)idos; IP, inhibidores de la proteasa; INI, inhibidores de la integrasa; n, número de pacientes. En 2 de los 55 pacientes el tiempo en TAR se desconocía y no se incluyeron en esta gráfica.

### Susceptibilidad prevista a los ARV

La mayoría de los niños y adolescentes con secuencia *pol* disponible estaban infectados con virus susceptibles a IP (88,9%) e INI (87,5%). Se observó un alto nivel de resistencia en el 70,8% de los sujetos a NVP, en un 64,6% a EFV, 45,8% a FTC o 3TC, 37,5% a RPV y menores tasas de resistencia para otros ARV, excepto para INI, que solo tenía resistencias secundarias (**Fig. 3.4 y Figura Sup. IV.1 - Anexo IV**). Al considerar tanto el nivel alto o intermedio de resistencia a los ITIAN, la mayoría (72,9% y 70,9%) de los pacientes presentaron resistencia alta e intermedia a NVP y EFV, respectivamente, el 41,7% a RPV, 39,6% a ETR y 33,3% a DOR. Para ITIAN, casi la mitad (47,9%) de los pacientes estaban infectados por virus con resistencia alta e intermedia a 3TC y FTC, 22,9% a AZT, 18,8% a ABC y 14,6% a TDF. Para los IP, estas tasas fueron inferiores al 10%, y para INI ausentes (**Figura 3.4 y Figura Sup. IV.1 - Anexo IV**).

**Figura 3.4. Predicción de la susceptibilidad a fármacos antirretrovirales según Stanford en pacientes con secuencias *pol* disponibles.**



**Leyenda Figura 3.4.** Predicción de susceptibilidad a ARV en 38PR/49RT/40IN secuencias disponibles de 55 pacientes en estudio. ITIAN, inhibidores de la retrotranscriptasa análogos de nucleós(t)idos; ITINAN, inhibidores de la retrotranscriptasa no análogos de nucleós(t)idos; IP, inhibidores de la proteasa; INI, inhibidores de la integrasa; ATV/r, Atazanavir/ritonavir; DRV/r, Darunavir; FPV/r, Fosamprenavir; IDV/r, Indinavir/ritonavir; LPV/r, Lopinavir/ritonavir; NFV, Nelfinavir; SQV/r, Saquinavir/ritonavir; TPV/r, Tipranavir/ritonavir; ABC, Abacavir; AZT, Zidovudina; D4T, Estavudina; DDI, Didanosina; FCT, Emtricitabina; 3TC, Lamivudina; TDF, Tenofovir; DOR, Doravirina; EFV, Enfaviriz; ETR, Etravirina; NVP, Nevirapina; RPV, Rilpivirina; BIC, Bictegravir; DGT, Dolutegravir; EVG, Elvitegravir; RAL, Raltegravir. Información de cada paciente en la **Figura Suplementaria IV.1 - Anexo IV**.

### DISCUSIÓN

Este capítulo representa la primera caracterización de resistencias a los ARV contra el VIH entre niños y adolescentes infectados por VIH en RDC, más concretamente en Kinshasa. Todos los estudios previos publicados de RDC aportaban datos de resistencia en adultos no tratados<sup>228,286,290,291</sup> o adultos tratados<sup>290,292</sup> con muestras recolectadas desde 2002 a 2014. Sin embargo, nuestro estudio analizó muestras más recientes, ya que fueron tomadas durante el periodo 2016-2018. Además, aportamos los primeros datos de resistencia a INI en ese país, lo cual es oportuno antes de la esperada implementación del dolutegravir (DTG) en RDC.

En RDC y otros países de África Subsahariana, la monitorización del VIH es limitada, debido a un sistema sanitario poco fortalecido. El diagnóstico molecular y las pruebas de CV son poco accesibles, y están centralizados principalmente en un único laboratorio nacional, o restringidos a algunos hospitales privados específicos. Además, la monitorización de resistencias no está disponible de manera rutinaria en el país<sup>117</sup>. Por estas razones, los cambios en el régimen del TAR están determinados por la disponibilidad de ARV, a veces restringidos por desabastecimientos<sup>314</sup>, interacción con otros fármacos, toxicidad y efectos secundarios en los pacientes.

Nuestro estudio en niños y adolescentes de Kinshasa reveló que 7 de cada 10 participantes con secuencias disponibles tenían MDR, 4 de cada 10 tenían doble resistencia a ITIAN+ITINAN y 1 de cada 10 triple resistencia a ITIAN+ITINAN+IP. Es de destacar que 7 de cada 10 pacientes con MDR a ITINAN tenían un nivel de resistencia intermedio o alto a EFV y NVP, ARV implicados en el TAR de primera línea en RDC. La carga de MDR primarias a IP observada en la población pediátrica tratada fue sustancialmente mayor que la reportada previamente en adultos tratados con VIH en el país<sup>228,290,292</sup>. Un tercio de los 55 niños y adolescentes con TAR con secuencia disponible presentaron viremia no suprimida en ausencia de virus resistentes, lo que sugiere que se requiere apoyo de adherencia al TAR en este colectivo pediátrico<sup>142</sup>.

Desde 2013, la OMS recomienda el uso de regímenes de TAR basados en IP para niños. En 2018 la OMS recomendó formalmente la eliminación de los ITINAN en todos los grupos de edad, y la introducción de DTG para niños. Sin embargo, en 2017 casi el

77% de los niños a nivel mundial seguían recibiendo NVP en el TAR de primera línea, debido al suministro limitado de formulaciones de medicamentos alternativas aptas para niños<sup>140,142</sup>. El DTG, incluido en 2019 en el TAR de primera línea en RDC, probablemente mejorará la supresión de la CV, reducirá la mortalidad y la incidencia del VIH en comparación con los regímenes basados en EFV<sup>142</sup>. Sin embargo, es importante monitorear su implementación y pronosticar el desarrollo de posibles MDR<sup>315</sup>. El tratamiento con INI sería, por tanto, una buena alternativa a los ITINAN debido a la alta presencia de MDR en esta familia de ARV, como observamos en nuestro estudio. Además, la ausencia de MDR primarias para INI en la población de estudio (que nunca estuvo expuesta a esta familia de medicamentos, excepto en un caso), respaldaría firmemente la implementación de un nuevo tratamiento basado en DTG en RDC. Sin embargo, la circulación de virus con MDR secundarias a residuos de INI (observado en el 15% de los pacientes) podría afectar la susceptibilidad de INI en combinación con otras sustituciones<sup>136</sup>. Aunque un estudio previo sugirió que la presencia de M184I/V o K65R (MDR a ITIAN) evitaría las resistencias a DTG<sup>316</sup>, esta hipótesis debería explorarse más a fondo.

Una limitación de este estudio es que se tomaron muestras en solo 2 hospitales en Kinshasa, una cohorte que no sería representativa de la situación a nivel de la ciudad o del país. Además, se requieren más análisis para monitorizar la transmisión actual de cepas resistentes a los ARV en niños y adolescentes infectados por VIH sin tratamiento previo en RDC. El tamaño de la muestra de estudio (55 pacientes con genotipos de resistencia), aunque modesto, fue similar a la de otros estudios de resistencia entre pacientes tratados en RDC, que analizan desde 55<sup>292</sup> a 93<sup>290</sup> secuencias *pol*. Además, los datos presentados son los primeros aportados sobre resistencia en niños y adolescentes bajo TAR en el país. Informes anteriores mostraron que las MDR en adultos *naïve* eran muy bajas en RDC antes del año 2007<sup>228,286</sup>, aunque algunos MRT en residuos de RT alcanzaron una prevalencia superior al 10% en las muestras recolectadas en Kinshasa durante 2013-2014<sup>291</sup>.

Los niveles de MDR antes del inicio del tratamiento son particularmente importantes en los niños, ya que estos tienen viremias más altas y una progresión más rápida de la enfermedad en comparación con los adultos<sup>64</sup>. Sin embargo, sería necesario conocer la

tasa de MRT en niños y adolescentes antes de recibir su primer tratamiento. Desafortunadamente, no podemos estimar la tasa de virus resistentes que podrían haberse transmitido como primera infección en nuestra cohorte de estudio. La tercera limitación fue la falta de información completa sobre el estado del VIH, el tratamiento y los datos de resistencia de las madres de los niños y adolescentes incluidos, lo que nos habría permitido identificar casos de transmisión vertical de MDR. Hay múltiples estudios que han demostrado que el porcentaje de pacientes con resistencia a los medicamentos aumenta de manera constante a medida que aumenta el tiempo de tratamiento<sup>290,317</sup>, como observamos en nuestro trabajo.

Todos los resultados generados se comunicaron a los médicos de Kinshasa responsables del seguimiento clínico de los niños y adolescentes en estudio para mejorar su atención clínica, proporcionando datos para la optimización del régimen de TAR. Este trabajo proporciona información única relacionada con estas poblaciones vulnerables en Kinshasa y en el resto del país, donde casi 3 millones de niños y adolescentes están infectados por VIH sin acceso ni a CV ni a la monitorización de resistencias tras la implantación del TAR. También reforzamos el uso de DBS como muestra útil y fácil de usar para realizar análisis de resistencias en países de bajos y medianos ingresos, como recomienda la OMS<sup>142</sup>.

La monitorización de MDR es un aspecto crucial en el control de la infección en países de bajos y medios ingresos, donde ocurren la mayoría de las infecciones pediátricas y de adolescentes. Además, es importante reforzar el apoyo a la adherencia e implementar la cuantificación de CV en la rutina clínica y las pruebas de resistencia en las directrices nacionales de RDC, fortaleciendo los laboratorios del país y descentralizando los análisis en la medida de lo posible. Nuestros hallazgos también apoyan los regímenes alternativos de TAR basados en IP e INI en sustitución de los inhibidores de la RT en la población de niños y adolescentes infectados por VIH en ese país. Estas mejoras ayudarían a controlar la propagación de virus resistentes entre las nuevas infecciones por VIH, acercando a RDC a los objetivos 95-95-95 de la OMS para 2030<sup>305</sup>.

## DIVULGACIÓN

El trabajo descrito en este capítulo ha sido aceptado como artículo de investigación, incluido en el **Anexo V**:

Rubio-Garrido M., Reina G., Ndarabu A., Rodríguez-Galet A., Valadés-Alcaraz A., Barquín D., Carlos S., Holguín A. High drug resistance levels could compromise the control of HIV infection in paediatric and adolescent population in Kinshasa, the Democratic Republic of Congo. *Plos One* (2021). Aceptado con correcciones. Factor de impacto: 2.766 (Q1).

También fue presentado en los siguientes congresos:

- Póster nº PEB0117 en 23rd International AIDS Conference 2020 (San Francisco/*online*, EEUU). Rubio-Garrido M., Reina G., Rodríguez-Galet A., Valadés-Alcaraz A., López-Pintor J.M., Ndarabu A., Mbikayi S, Makonda B., Carlos S., Holguín A. *High drug resistance levels compromise the control of HIV in paediatric and adolescent population in Kinshasa, Democratic Republic of Congo.*
- Póster nº P189 en X Congreso Nacional GeSIDA 2018 (Madrid, España). Rubio-Garrido M., Ndarabu A., Reina G., Barquín D., Gutiérrez M., Carlos S., Fernández-Alonso M., Holguín A. *HIV-1 diagnosis and virological analysis using dried blood from an infected pediatric population from Kinshasa, Democratic Republic of Congo.*

La divulgación a la sociedad se realizará cuando se publique el artículo científico.



# Capítulo 4

**Estudio piloto del efecto  
de la exposición al VIH  
sobre el perfil  
inmunitario y la  
inflamación en población  
pediátrica**

## JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La implementación de programas PTMH reduce el número de niños recién nacidos infectados. Sin embargo, existe una alta incidencia del VIH en embarazadas y la falta de pruebas diagnósticas del VIH y el control de la viremia para estas mujeres durante el embarazo y posparto contribuyen sustancialmente a la transmisión viral y a la exposición al VIH de los bebés durante el embarazo y la lactancia en entornos con una alta prevalencia de VIH y recursos limitados. Estos niños expuestos al virus tienen un mayor riesgo de morbilidad infecciosa, mortalidad y retraso del crecimiento observado que los no expuestos<sup>166</sup>. Ello se debe a una mayor activación inmunitaria e inflamación<sup>162-164</sup>, a una menor funcionalidad de las células T y a una mayor activación de monocitos en los niños expuestos frente a los no expuestos<sup>163,318</sup>.

El objetivo de este estudio ha sido analizar la influencia de la infección y exposición al VIH-1 sobre el estado inmunológico en tres grupos de población pediátrica en seguimiento clínico en el Hospital Monkole de Kinshasa, RDC, entre abril y noviembre de 2016: 10 niños infectados por VIH (en adelante niños infectados o VIH+), 10 expuestos al VIH pero no infectados (en adelante denominados niños expuestos), y 10 no expuestos ni infectados (en adelante denominados niños no expuestos). Para ello, medimos 10 nuevos biomarcadores inmunes en muestras de DBS donde se observará la utilidad de este tipo de muestra como alternativa a muestras de plasma o suero. El estado del VIH de todos ellos se verificó por la técnica molecular Xpert HIV-1 Qual, tal y como se describió en el apartado “Diagnóstico de VIH y cuantificación de viremia” de **Materiales y Métodos**. Este estudio se considera un estudio piloto de casos y controles, en el que el grupo de niños no expuestos es el grupo control y comparamos sus resultados con los otros dos grupos. El trabajo se realizó en colaboración con el laboratorio de Inmunología de Tumores del Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario La Paz (IdiPaz), en Madrid.

## RESULTADOS

### Población de estudio

Las principales características de la población pediátrica del estudio se muestran en la **Tabla 4.1**. Los niños infectados y los no expuestos presentaron una mediana de edad similar a fecha de toma de muestra, más alta que el grupo de niños expuestos (12 y 10,5 años frente a 3 años, respectivamente). Todos los niños VIH+ estaban bajo TAR, aunque ninguno presentó viremia suprimida en el momento del muestreo. En el grupo de niños expuestos, siete pacientes habían recibido previamente ARV, 5 de ellos como profilaxis. Cuatro pacientes del grupo de niños expuestos presentaron anticuerpos maternos anti-VIH, siendo todos ellos menores de 18 meses (de 0 a 4,8 meses).

**Tabla 4.1. Principales características de los grupos pediátricos de estudio.**

	Niños VIH+	Niños expuestos	Niños no expuestos
Número de niños	10	10	10
Género (masculino)	6	5	5
Edad media a toma de muestra en años [RIC]	12 [10,7-15,3]	3 [0-8,5]	10,5 [8,3-12]
Lactancia materna	5	7	desconocido
Estados serológico positivo frente al VIH (Geenius)	10	4	0
Diagnóstico molecular positivo frente al VIH (Xpert HIV-1 Qual)	10	0	0
Exposición a ARV tras el nacimiento	10	7 (5 profilaxis)	0-
CV media (log/ml) por Cobas Roche (rango)	4,3 (2,7-5,3)	-	-

**Leyenda Tabla 4.1.** VIH+, niños infectados por VIH-1; niños expuestos, niños expuestos al VIH pero no infectados; niños no expuestos, niños sanos, no expuestos ni infectado por VIH; CV, copias de RNA de VIH-1 por mililitro de plasma (ml); log, logaritmo; ARV, fármacos antirretrovirales; Geenius, Bio-Rad Geenius™ HIV 1/2 Confirmatory Assay<sup>236</sup>; Xpert HIV-1 Qual, Cepheid Xpert HIV-1 Qual<sup>193</sup>.

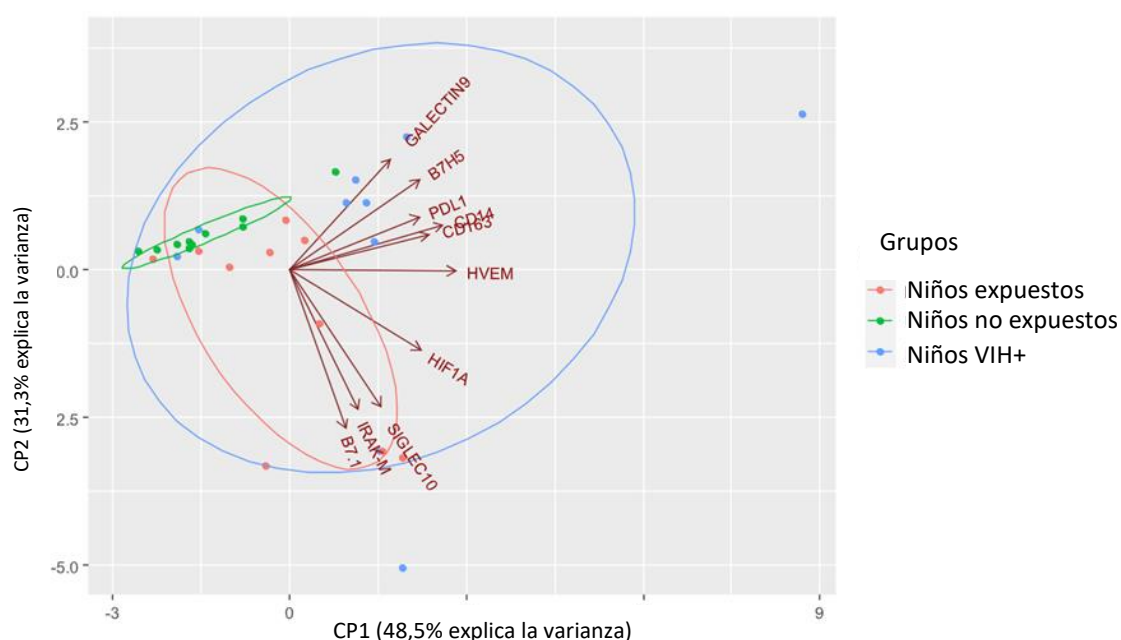
### Los niños infectados, expuestos y no expuestos al VIH tienen perfiles diferentes de marcadores inmunes

Para identificar los efectos de la infección y la exposición al VIH sobre el estado inmunológico, decidimos estudiar las diferencias generales entre los grupos de niños. Para ello, realizamos un análisis de componentes principales (ACP) para la expresión de los 10 marcadores inmunes en nuestra cohorte. Los 4 componentes principales explicaron el 90,24% de la varianza (**Tabla 4.2**) y mostraron que los perfiles de marcadores inmunes en los niños no expuestos diferían sustancialmente de los niños expuestos y los grupos infectados por VIH (**Figura 4.1**).

**Tabla 4.2. Análisis de componentes principales de diez marcadores inmunes en 30 muestras de la cohorte pediátrica del estudio.**

Componentes principales	1	2	3	4
Valores vectoriales para el componente				
B7.1	0,145	<b>0,511</b>	0,234	0,141
B7-H5	0,338	-0,290	-0,215	-0,484
CD14	<b>0,398</b>	-0,146	0,048	0,004
CD163	0,361	-0,114	<b>0,463</b>	0,249
HIF-1 $\alpha$	0,342	0,258	-0,378	0,009
HVEM	0,433	0,003	0,030	-0,102
IRAK-M	0,179	0,449	-0,238	-0,467
Galectin-9	0,262	-0,357	0,386	-0,231
PD-L1	0,338	-0,172	-0,486	<b>0,624</b>
Siglec-10	0,239	0,441	0,310	0,111
Porcentaje de la varianza total explicado por el componente	48,5%	31,3%	6,3%	4,1%

**Figura 4.1. Resultado gráfico del ACP de los perfiles de los biomarcadores inmunes en niños de RDC.**



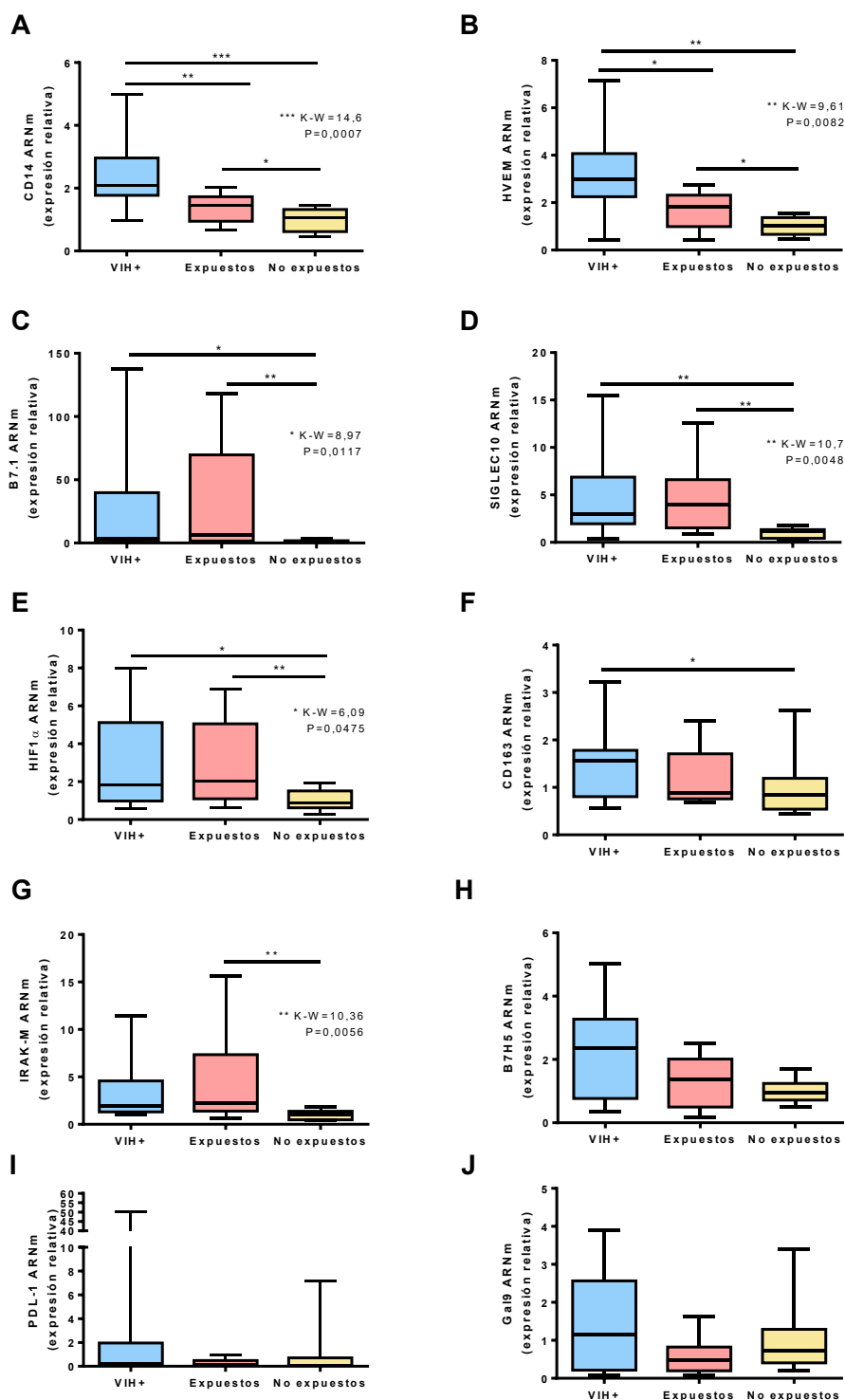
**Leyenda Figura 4.1.** Los resultados se representan de acuerdo con los 2 primeros componentes principales que representan el 79,8% de la variación total (Componente 1 = 48,5% y Componente 2 = 31,3%). Cada punto representa los datos de una sola muestra de niño: expuestos al VIH pero no infectados en naranja; infectado por VIH (VIH +) en azul; no expuesto al VIH y no infectado en verde. La agrupación de muestras está representada por su respectiva elipse de intervalo de confianza del 95% desde el centroide. Los vectores de cada marcador inmunológico están representados por líneas rojas.

Una vez comprobadas las diferencias en los perfiles inmunológicos entre los grupos, decidimos estudiar el perfil de expresión de cada marcador por separado. Identificamos algunos marcadores inmunes aumentados en niños con infección por VIH al comparar los grupos de niños infectados, expuestos y no expuestos. Así, los niños VIH+ presentaron niveles significativamente más altos en 6 de los 10 biomarcadores (CD14, HVEM, B7.1, Siglec-10, HIF-1 $\alpha$  y CD163) que los del grupo de niños no expuestos (**Fig. 4.2A-2F**). El supresor de activación de linfocitos T B7H5 también exhibió una mayor expresión en el grupo de niños infectados que en el grupo de no expuestos, pero sin significación estadística (**Fig. 4.2H**). Por un lado, cinco de estos biomarcadores (CD14, HVEM, B7.1, Siglec-10, HIF-1 $\alpha$ ) se relacionaron tanto con la exposición al VIH como con la infección, presentando una expresión significativamente mayor en los grupos de niños infectados y expuestos respecto al grupo de no expuestos. (**Fig. 4.2A-E**). CD14 y HVEM se expresaron significativamente más en el grupo de VIH+ que en el de niños expuestos (**Fig. 4.2A-B**), pero la expresión de B7.1, Siglec-10, HIF-1 $\alpha$ , CD163, IRAK-M, B7H5, PD-L1 y Galectina-9 fue similar en ambos grupos (**Fig. 4.2C-J**).

Por otro lado, encontramos marcadores inmunes con sobre expresión tras la exposición al VIH. Así, al comparar niños expuestos con los no expuestos, 6 biomarcadores presentaron unos valores significativamente más elevados en el grupo de niños expuestos (CD14, HVEM, B7.1, Siglec-10, HIF-1 $\alpha$  e IRAK-M) (**Fig. 4.2A-E, 4.2G**). IRAK-M solo se incrementó por la exposición al VIH, aumentando significativamente sus niveles en el grupo de niños expuestos con respecto al grupo de niños no expuestos (**Fig. 4.2G**).

El resto de biomarcadores no parecieron verse afectados por la exposición o infección por VIH. Los niveles de B7H5 (**Fig. 4.2H**), PD-L1 (**Fig. 4.2I**) y Galectin-9 (**Fig. 4.2J**) no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Sin embargo, la expresión de B7H5 tendió a ser más alta en el grupo de niños infectados en comparación con los grupos de niños expuestos y no expuestos, y en el grupo de niños expuestos frente al grupo de no expuestos.

**Figura 4.2.** Expresión de marcadores inmunes en niños infectados con VIH, niños expuestos y niños no expuestos de la población de estudio.



**Legenda Figura 4.2.** Expresión relativa por RT-qPCR de los genes de CD14, HVEM, B7.1, HIF-1 $\alpha$ , Siglec 10, IRAK-M, CD163, B7H5, PD-L1 y Galectina-9 en ARNm extraído desde DBS de la cohorte pediátrica de RDC. VIH+, niños infectados por VIH; expuestos, niños expuestos al VIH, pero no infectados; no expuestos, niños no expuestos ni infectados por VIH; El *p*-valor y de Kruskal Wallis statistics (K-W) se muestran para los biomarcadores con diferencias de expresión estadísticamente significativas entre grupos empleando la prueba U de Mann-Whitney: \*, *p*<0,05; \*\*, *p*<0,01; \*\*\*, *p*<0,001.

## DISCUSIÓN

La monitorización del estado inmunológico podría predecir el riesgo de las comorbilidades relacionadas con el VIH y la disfunción inmunitaria crónica, especialmente de la inflamación persistente debido a la infección crónica por VIH, la cual contribuye a un mayor riesgo de morbilidad y mortalidad entre las personas infectadas<sup>168,171</sup>. En este contexto, este estudio piloto aporta datos pioneros sobre la expresión de 10 marcadores inmunes en tres grupos de pacientes pediátricos con o sin infección o exposición al VIH. Se incluyeron CD14 y CD163, al ser los biomarcadores inmunes de origen mieloide con mayor impacto clínico en la predicción de la morbilidad y la mortalidad<sup>209,319,320</sup>. Nuestros datos de ACP y el análisis de cada marcador demostraron que tanto la exposición al VIH durante el embarazo, como la infección por VIH, alteran el perfil inmunológico. Es importante destacar que este trabajo es el primer estudio que utiliza sangre seca en lugar de plasma/suero para medir la expresión génica de estos marcadores inmunitarios específicos.

Se sabe que la infección por VIH aumenta los niveles plasmáticos de algunos biomarcadores inmunes solubles<sup>172–174,321</sup>, incluso en pacientes infectados por VIH con TAR bien controlados y viremia suprimida<sup>168,174</sup>. En nuestro estudio observamos que los niños VIH+ presentaban niveles significativamente más altos de 6 biomarcadores (CD14, HVEM, B7.1, Siglec-10, HIF-1 $\alpha$  y CD163) en comparación con el grupo de niños no expuestos. Estos resultados coinciden con estudios previos que informaban un aumento de CD14 soluble y CD163 en plasma asociado con la infección por VIH<sup>174,321</sup> y un nivel más alto de CD163 en macrófagos infectados con VIH debido a la inflamación crónica<sup>322</sup>. CD163 se ha asociado de forma independiente con enfermedad renal crónica, enfermedad pulmonar crónica y enfermedad hepática en personas infectadas en TAR<sup>322</sup>. En cuanto a la exposición al VIH, nuestro estudio piloto proporciona los primeros datos sobre una expresión de ARNm significativamente mayor de 6 biomarcadores inmunes (CD14, HVEM, B7.1, Siglec-10, HIF-1 $\alpha$  e IRAK-M) en niños infectados y expuestos al VIH frente a niños no expuestos. De hecho, solo unos pocos estudios han analizado los biomarcadores inmunes (principalmente solubles) en niños expuestos, describiendo una menor funcionalidad de las células T tras estímulos de patógenos<sup>318</sup>, y una mayor inflamación y activación de monocitos por niveles elevados de algunos biomarcadores



inflamatorios solubles en plasma en adultos expuestos en comparación con adultos no expuestos<sup>163,172</sup>. Por otro lado, IRAK-M se ha asociado con enfermedades inflamatorias del intestino<sup>323</sup>. Sin embargo, ningún estudio previo ha cuantificado los niveles de ARNm de los 10 biomarcadores analizados en niños expuestos en comparación con niños VIH+ y no expuestos, como hemos realizado en este estudio piloto.

Curiosamente, 5 de los biomarcadores estudiados (CD14, HVEM, B7.1, Siglec-10, HIF-1 $\alpha$ ) presentaron una expresión significativamente mayor tanto en niños con VIH como en expuestos frente a no expuestos. HVEM y CD14 estaban significativamente sobreexpresados en niños infectados por VIH comparado con niños expuestos. Se sabe que HVEM se expresa principalmente en las células T-CD4 infectadas con VIH y participa en la entrada del virus<sup>324</sup>, lo que podría explicar la mayor expresión de HVEM observada en los niños infectados por VIH en comparación con los niños expuestos y no expuestos. Sin embargo, queda por aclarar la razón por la que HVEM también se expresa más en el grupo de niños expuestos frente al de no expuestos. Por otra parte, se sabe que HIF-1 $\alpha$  se acumula en presencia de infección por VIH, ya que la proteína vpr del VIH-1 activa la vía del estrés oxidativo necesaria para la expresión de HIF-1 $\alpha$ , lo que explicaría los altos niveles de HIF-1 $\alpha$  en presencia de VIH<sup>325</sup>. Sin embargo, el grupo de niños expuestos presentó también una alta expresión de HIF-1 $\alpha$  similar al grupo VIH+ a pesar de la ausencia de infección por VIH y, por tanto, de la proteína viral vpr. Por ello, aún queda aclarar los mecanismos moleculares alternativos para la sobreexpresión de HIF-1 $\alpha$  en niños expuestos frente al grupo de no expuestos, como ocurre en otros contextos clínicos como el cáncer de pulmón<sup>326</sup>. Con respecto a B7.1, se sabe que la proteína nef del VIH-1 elimina B7.1 de la superficie celular modificando las rutas de Golgi y previniendo la activación de los linfocitos T<sup>327</sup>. Siglec-10 se detectó en subconjuntos de leucocitos humanos, incluidos eosinófilos, monocitos y una población menor de células *natural-killer*, y podría funcionar como un receptor inhibidor dentro del sistema inmunológico innato<sup>328</sup>. Sin embargo, dado que ambos biomarcadores también estaban significativamente elevados en el grupo de niños expuestos frente al de no expuestos en ausencia de proteínas virales, es necesario estudiar más a fondo el efecto de la exposición al VIH en el ARNm B7.1 y la expresión de Siglec-10.

Los niveles de B7H5, PD-L1 y Galectin-9 fueron similares entre los grupos, lo que sugiere un efecto bajo de la presencia o exposición al VIH en su expresión. Sin embargo, los niveles del supresor de activación de células T y una nueva molécula coestimuladora que regula las respuestas de las células T en la familia de moléculas B7, B7H5 tendían a ser más altos en el grupo de niños con VIH que en los grupos de niños expuestos y no expuestos, así como en el grupo de niños expuestos frente al de no expuestos. También se ha informado que esta molécula está implicada en el cáncer<sup>329</sup> pero, hasta donde sabemos, nunca se ha informado sobre su papel en la infección por VIH.

Aunque nuestro estudio analizó 10 biomarcadores inmunes, más que en la mayoría de los estudios relacionados, la principal limitación que presenta es que se trata de un estudio piloto que analiza una pequeña cohorte pediátrica. Sin embargo, a pesar del bajo número de participantes en cada grupo, observamos diferencias significativas en los perfiles de expresión de biomarcadores inmunes entre ellos. Esto sugiere que la infección y/o exposición al VIH tiene un efecto en la sobreexpresión de estos biomarcadores inmunes, aunque requerirá ser estudiada en detalle en cohortes con mayor número de pacientes. Las consecuencias de este estado inmunológico alterado encontrado en niños expuestos vs. no expuestos podrían ser más devastadoras que en los adultos, debido a la presencia de inflamación en los niños durante los años de crecimiento, maduración de órganos y desarrollo neurocognitivo<sup>163</sup>. Se requieren investigaciones futuras para evaluar si estas alteraciones inmunes persisten más allá de la infancia y, de ser así, cuáles serían las consecuencias a largo plazo de la inflamación persistente.

Otra limitación de este trabajo es que no se ha tenido en cuenta el posible efecto de la exposición a los ARV en la población de estudio, ya que este reduciría drásticamente la inflamación sistémica y la activación inmune en los 10 niños infectados en TAR, aunque no a niveles comparables con la población no infectada por VIH<sup>330</sup>. Además, el efecto de cada ARV sobre la inflamación y la activación inmunitaria en el VIH aún está en investigación<sup>330</sup>.

Una tercera limitación, es que los niños expuestos al VIH tenían una edad menor que los otros grupos de niños. Sin embargo, el efecto de la edad de los niños sobre la expresión de marcadores inmunitarios sigue sin estar claro. Aunque algunos estudios

han observado un aumento significativo relacionado con la edad en CD14 insoluble y otros biomarcadores en niños expuestos<sup>331</sup>, otros solo han encontrado niveles significativamente más altos en niños expuestos al nacer, y los niveles se normalizaron después de 6 meses<sup>163</sup>. Este fenómeno reforzaría la idea de que el mayor nivel de expresión de algunos biomarcadores en niños expuestos vs. no expuestos podría deberse a la exposición al VIH y no a la edad.

La fortaleza de nuestro estudio piloto es que presentamos datos sobre el nivel de expresión génica de 10 moléculas *immunocheckpoint* o puntos de control inmunitarios, algunas de las cuales nunca antes se habían informado en niños expuestos o en la infección por VIH, como Siglec-10 o IRAK-M, en base a la ausencia de bibliografía relacionada hasta la actualidad. Nuestros resultados demuestran que la exposición al VIH, y no solo la infección por VIH, alteran el nivel de algunos biomarcadores inmunitarios en la población pediátrica en estudio. Esos biomarcadores elevados podrían contribuir a un peor estado físico relacionado con la inflamación crónica en niños expuestos<sup>164</sup>. Además, dado que no hubo monitorización de CD4/CD8 de los niños de Kinshasa en estudio, proporcionamos los primeros datos relacionados con su estado inmunológico.

Nuestros hallazgos sugieren que la monitorización del perfil inmunológico mediante la cuantificación de biomarcadores inmunitarios en sangre podría integrarse en los programas de PTMH para monitorizar la inflamación en los recién nacidos infectados por VIH, así como en los niños no infectados pero expuestos, nacidos de madres infectadas por VIH.

Por último, también evidenciamos, por primera vez, que el uso del DBS podría incorporarse en estudios que requieran la cuantificación del ARNm de la expresión de cualquier gen del hospedador, disminuyendo los requisitos actuales de volumen de muestra de sangre y procesamiento de sangre para la preparación de plasma/suero normalmente usados para la realización de este tipo de ensayos. Por ello, el uso de sangre seca para la monitorización de *immunocheckpoints* podría ser muy útil en entornos con una infraestructura limitada para el procesamiento de sangre o cuando hay un volumen de sangre bajo disponible, como en los recién nacidos o niños de bajo peso. Sin embargo, se requieren más estudios que comparen los niveles de expresión

de biomarcadores en muestras pareadas de DBS/plasma y en conjuntos de poblaciones más grandes.

### DIVULGACIÓN

El trabajo descrito en este capítulo ha sido enviado como artículo de investigación a la revista *Medicine* (Q2) e incluido en el **Anexo V**: Rubio-Garrido M., Avendaño-Ortiz J., Ndarabu A., Rubio C., Reina G., López-Collazo E., Holguín A. Effect of HIV exposure and infection on immune profile: a pilot study on a paediatric population. En revisión.

El trabajo fue presentado a los siguientes congresos:

- Poster nº TUPEC444 en el 10th IAS Conference on HIV Science 2019 (Ciudad de México, México). Rubio-Garrido M., Avendaño-Ortiz J., Ndarabu A., Reina G., Carlos S., Llanos-González E., Holguín A., López-Collazo E. *Immune biomarkers are associated with HIV exposure or infection in children using DBS.*
- Poster nº P-089 en el XI Congreso Nacional GeSIDA 2019 (Toledo, España). Rubio-Garrido M., Avendaño-Ortiz J., Ndarabu A., Reina G., Carlos S., Llanos-González E., Holguín A., López-Collazo E. *Immune biomarkers are associated with HIV exposure or infection in children using DBS.*
- Poster nº P-224 en el X Congreso Nacional GeSIDA 2018 (Madrid, España). Rubio-Garrido M., Avendaño-Ortiz J., Ndarabu A., Reina G., Carlos S., Llanos-González E., Holguín A., López-Collazo E. *Dried Blood Spots: a tool to monitor inflammation on HIV patients. Testing a pediatric cohort from the Democratic Republic of Congo.*

# Capítulo 5

# **Evaluación del grado de inmunización frente a seis patógenos vacunables en niños de Kinshasa, RDC**

## JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El aumento de la cobertura vacunal infantil evita de 2 a 3 millones de muertes cada año, y todavía hay margen para salvar más vidas<sup>332</sup>. A pesar de este progreso, solo en 2019, más de 7,4 millones de niños, adolescentes y jóvenes murieron por causas tratables o bien, prevenibles por vacunación, como la tuberculosis, el sarampión, diarreas e infecciones del tracto respiratorio inferior<sup>176</sup>. La vacunación infantil es, por tanto, una de las formas más eficaces de reducir las tasas de mortalidad infantil en el mundo<sup>333,334</sup>. Datos recientes estimaron que el 62% de los 19,7 millones de los niños no vacunados o con vacunación incompleta viven en RDC, Angola, Etiopía, India, Indonesia, Nigeria, Pakistán, Filipinas, Brasil y México<sup>179</sup>.

RDC presenta una alta tasa de mortalidad en niños menores de 5 años, alcanzando 85 por cada 1000 nacidos vivos<sup>175</sup>. El aumento en la cobertura mundial de vacunas ha reducido la enfermedad, la morbilidad y la muerte en los niños<sup>179,335</sup>. Sin embargo, las enfermedades prevenibles por vacunación, como la tuberculosis y las infecciones del tracto respiratorio inferior, siguen siendo la principal causa de muerte pediátrica en RDC<sup>162,178</sup>. Los brotes periódicos en el país de sarampión se propagan rápidamente entre las poblaciones no vacunadas o con vacunación incompleta. En 2014 se estimó que más de 764.400 niños no estaban vacunados en RDC<sup>336</sup>. Según los datos de la OMS de 2019, la cobertura de la tercera dosis de difteria, tétanos y tosferina (DTP), ampliamente utilizada como indicador de la capacidad de un país para proporcionar servicios de inmunización, fue del 57% en bebés de 0 a 6 meses en RDC y también para la primera y única dosis de la vacuna contra el sarampión administrada a los 9 meses de edad<sup>180</sup>. Esta baja cobertura da lugar a brotes periódicos de sarampión con miles de muertes infantiles<sup>181</sup>. Por desgracia, no se dispone de datos que nos permitan conocer la cobertura de rubeola en el país<sup>180</sup>.

En particular, los niños que viven con VIH tienen mayor riesgo de padecer estas enfermedades infecciosas prevenibles por vacunación en comparación con los niños no expuestos<sup>183,184,337</sup> y tienen una menor protección. Ello se debe a que generan un menor número de anticuerpos, a pesar de haber sido vacunados frente a algunas enfermedades infecciosas<sup>187</sup>. La proporción de niños con VIH que alcanza títulos de

anticuerpos protectores es variable. Sin embargo, se ha observado en general, que porcentajes más altos de linfocitos CD4 y una baja CV se asocian con mejores respuestas a las vacunas<sup>184</sup>.

Los DBS representan una muestra conveniente para la detección de anticuerpos durante la monitorización de la cobertura de vacunación pediátrica real en países de recursos limitados<sup>85,87,97</sup>, donde viven la mayoría de niños con VIH, al ser fáciles de recolectar, almacenar y transportar sin necesidad de cadena de frío.

El objetivo de este trabajo fue hacer un estudio piloto para evaluar la inmunización o presencia de IgG en plasma generados frente a 6 enfermedades infecciosas vacunables en un grupo de niños y adolescentes de Kinshasa. Además, nuestro estudio aporta los primeros datos sobre la validez de los DBS para monitorizar la protección inmunológica frente a los mismos 6 patógenos, estableciendo los valores de corte que proporcionan una sensibilidad y/o especificidad óptimas para cada infección en la cohorte de estudio si se emplea DBS como muestra alternativa al suero.

Para ello se emplearon muestras de sangre seca de 143 niños y adolescentes en seguimiento clínico en las Unidades Pediátricas de los hospitales de Monkole y Kalembelembe en Kinshasa, RDC, tomadas entre 2016 y 2018. De 42 (29,4%) de ellos también se pudo obtener plasma pareado preparado a partir de la misma muestra de sangre con la que se preparó el DBS. Por tanto, en 42 pacientes disponíamos de plasma/DBS pareados y en 101 solo de DBS. La metodología empleada se indica en el apartado “Cuantificación de Inmunoglobulinas G protectoras frente a 6 enfermedades vacunables” de la sección de **Materiales y Métodos**.

Este estudio se realizó con la colaboración del Laboratorio de Virología del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal en Madrid, cuyo responsable es el Dr. Juan Carlos Galán.



## RESULTADOS

### Población de estudio

La mediana de la edad de los 143 pacientes en estudio fue de 11 años y el 52,4% eran varones. De ellos, 52 (36,4%) estaban infectados con VIH, y 42 (29,4%) tenía CV por encima de las 1.000 cp/ml (**Tabla 5.1**), a pesar de que la mitad (52,4%) había tenido experiencia con algún régimen antirretroviral o profilaxis en el momento de toma de muestra. Uno de cada dos pacientes infectados con secuencia viral disponible (52,6%) estaban infectados por subtipos puros no-B en *pol* y el 42,1% por cepas recombinantes, principalmente URF (39,5%) (**Tabla 5.1**).

**Tabla 5.1. Características de la población de estudio de Kinshasa (RDC) con plasma y/o DBS disponible**

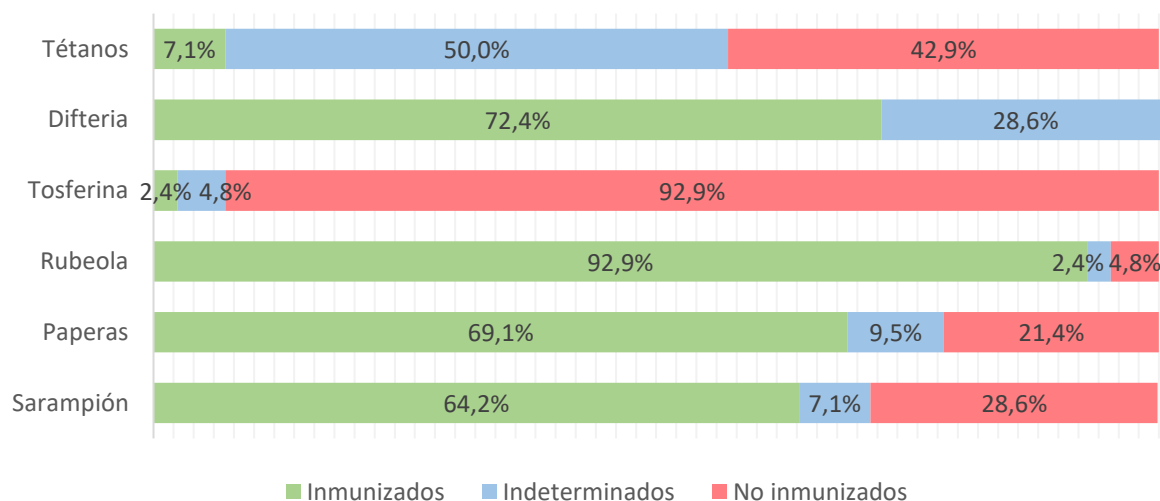
	DBS/plasma pareado	Solo DBS	TOTAL
<b>Muestras totales disponibles</b>	42 (100)	101 (100)	143 (100)
<b>Género masculino</b>	19 (45,2)	56 (55,4)	75 (52,4)
<b>Edad (mediana) a toma de muestra[RIC]</b>	14 [12-17]	9 [3-12,8]	11 [5-14]
<b>&lt; 1 año</b>	1 (2,4)	18 (17,8)	19 (13,3)
<b>≥1-5</b>	0	12 (11,9)	12 (8,4)
<b>≥5-10</b>	5 (11,9)	22 (21,8)	27 (18,9)
<b>≥10-15</b>	16 (38,1)	32 (31,7)	48 (33,5)
<b>≥15</b>	18 (42,9)	16 (15,8)	34 (23,8)
<b>desconocido</b>	2 (4,7)	1 (1)	3 (2,1)
<b>Estado del VIH</b>			
<b>VIH+</b>	38 (90,5)	14 (13,9)	52 (36,4)
<b>VIH-</b>	4 (9,5)	87 (86,1)	91 (63,6)
<b>CV &gt;1,000cp/ml por Roche-CV</b>	31 (73,8)	11 (10,9)	42 (29,4)
<b>Experiencia a ARV</b>	39 (92,9)	23 (22,8)	75 (52,4)
<b>Estado VIH de las madres</b>			
<b>VIH+</b>	17 (40,5)	43 (42,6)	60 (41,9)
<b>VIH-</b>	4 (9,5)	24 (23,7)	28 (19,6)
<b>Desconocido</b>	21 (50)	34 (33,7)	55 (38,5)
<b>Variantes del VIH-1</b>	Sec=27	Sec=11	Sec=38
<b>Subtipos puros no-B</b>	14 (51,9)	6 (54,5)	20 (52,6)
<b>CRF</b>	0	1 (9,1)	1 (2,6)
<b>URF</b>	12 (44,4)	3 (27,3)	15 (39,5)
<b>U</b>	1 (3,7)	1 (9,1)	2 (5,3)

**Leyenda Tabla 5.1.** Datos de acuerdo a las fichas clínicas. RDC, República Democrática del Congo; DBS, *dried blood spots* o muestras de sangre seca; TAR, tratamiento antirretroviral; ARV, fármacos antirretrovirales; RIC, rango intercuartílico; cp/ml, copias de ARN del VIH-1 por mililitro; CV, carga viral; CRF, formas recombinantes circulantes; URF, formas recombinantes únicas; U, inclasificables. CV cuantificada por Roche Cobas v2.0, límite de cuantificación <20 cp/ml. cp/ml, copias de ARN del VIH-1 por mililitro de plasma; corregido a partir de las cp/círculo de DBS considerando el hematocrito<sup>196</sup>.

### Nivel de inmunización en plasma de la población pediátrica

Los resultados en los 42 plasmas, mostraron que la cohorte tenía una protección inmunológica frente a rubeola del 92,9%, a difteria del 72,4%, a paperas del 69,1%, a sarampión del 64,2% y solo del 7,1% a tétanos y del 2,4% a tosferina (**Fig. 5.1**). Por tanto, encontramos que el 92,9% de los niños no presentaban protección de IgG frente a tosferina, el 42,9% frente a tétanos, el 28,6% frente al sarampión y el 21,4% a paperas. Es importante destacar que observamos un porcentaje de pacientes con resultados indeterminados en plasma, que era variable para cada patógeno, oscilando entre el 2,4% para rubeola y el 50% para tétanos (**Fig. 5.1**). Los valores indeterminados fueron excluidos de los cálculos finales.

**Figura 5.1. Porcentaje de inmunización de los 42 pacientes pediátricos y adolescentes con plasma disponible.**



### Cálculo de *cut-off* para cada marcador empleando DBS

Uno de los objetivos del estudio fue evaluar la posible utilidad de los DBS para monitorizar la presencia de IgG protectoras frente a los mismos 6 patógenos, con el fin de usar sangre seca en circunstancias donde el suero o plasma no estuvieran disponibles. Para ello empleamos los 42 DBS pareados con los 42 plasmas previamente evaluados que habían sido preparados a partir de la misma muestra de sangre de los pacientes.

Cuando se utilizó el mismo *cut-off* o punto de corte establecido por la casa comercial para plasma, observamos que en los 42 DBS pareados la sensibilidad de cada prueba VirClia® IgG para la detección de anticuerpos protectores fue del 97-100% para tosferina, difteria, paperas, rubeola, y menor para sarampión (81,8%) y tétanos (66,7%)

en DBS. La especificidad se mantuvo cercana al 100% para tosferina (97,6%), pero disminuyó para tétanos (87,2%), sarampión (40%), paperas (7,7%), difteria y rubeola (0%).

Por ello, calculamos un nuevo *cut-off* para cada prueba, con el fin de alcanzar una óptima sensibilidad y/o especificidad en DBS. El valor predictivo positivo (VPP) osciló entre el 28,6% (tétanos) y el 92,7% (rubeola), mientras que las cifras mejoraron al aplicar el *cut-off* óptimo de DBS. Teniendo en cuenta el valor predictivo negativo (VPN), los valores oscilaron entre 0% en rubeola y difteria y 100% para paperas y tosferina utilizando el punto de corte definido por Vircell para plasma, aumentando del 38,5% al 100% cuando se aplicó el nuevo *cut-off* para DBS (**Tabla 5.2**).

Sin embargo, es esencial destacar que estos valores de *cut-off* proporcionados en la tabla para DBS solo podrían ser aplicables a esta cohorte de estudio concreta, con una exposición o vacunación frente a cada patógeno particular.

**Tabla 5.2. Resultados de las pruebas VirClia®IgG para la detección de IgG protectoras contra 6 patógenos responsables de enfermedades prevenibles mediante vacunación utilizando sangre seca de 42 pacientes pediátricos.**

		SARAMPIÓN					PAPERAS					RUBEOLA				
		<i>Cut-off</i>	Sen	Esp	VPP	VPN	<i>Cut-off</i>	Sen	Esp	VPP	VPN	<i>Cut-off</i>	Sen	Esp	VPP	VPN
<b>PLASMA</b>		>1,1	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	>1,1	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	>1,1	99%	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>
<b>DBS con <i>cut-off</i> de PLASMA</b>		>1,1	81,8%	40%	71%	54,6%	>1,1	<b>100%</b>	7,7%	70,7%	<b>100%</b>	>1,1	97,4%	0%	92,7%	0%
<b>DBS</b>	Max Sen	≥0,73	<b>100%</b>	13,3%	67,5%	<b>100%</b>	>1,1	<b>100%</b>	7,7%	70,7%	<b>100%</b>	>1,04	<b>100%</b>	0%	95%	0%
	Max Esp	≥2,83	55,6%	<b>100%</b>	<b>100%</b>	55,6%	≥6,18	37,9%	100%	<b>100%</b>	41,9%	≥3,97	43,6%	<b>100%</b>	<b>100%</b>	12%
	Sen y Esp óptima	≥2,7	59,3%	93%	94%	56%	≥5,19	55,2%	76,9%	84%	43%	≥1,84	92,3%	66,7%	97,3%	40%
		DIFTERIA					TÉTANOS					TOSFERINA				
		<i>Cut-off</i> (UI/ml)	Sen	Esp	VPP	VPN	<i>Cut-off</i> (UI/ml)	Sen	Esp	VPP	VPN	<i>Cut-off</i> (UI/ml)	Sen	Esp	VPP	VPN
<b>PLASMA</b>		>0,01	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	>0,2	96%	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	>120	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>
<b>DBS con <i>cut-off</i> de PLASMA</b>		>0,01	<b>100%</b>	0%	71,4%	0%	>0,2	66,7%	87,2%	28,6%	97,1%	>120	<b>100%</b>	97,6%	50%	<b>100%</b>
<b>DBS</b>	Max Sen	≥0,03	<b>100%</b>	25%	76,9%	<b>100%</b>	≥0,11	<b>100%</b>	46,2%	12,5%	<b>100%</b>	≥586	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>
	Max Esp	≥0,1	36,7%	<b>100%</b>	<b>100%</b>	38,7%	≥0,5	33,3%	<b>100%</b>	10%	95,1%	≥586	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>
	Sen y Esp óptima	≥0,09	46,7%	83,3%	78,5%	38,5%	≥0,24	66,7%	89,7%	33,3%	97,2%	≥586	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>

**Leyenda Tabla 5.2.** DBS; muestras de sangre seca; Max, máximo; Sen, sensibilidad; Esp, especificidad; VPP, valor predictivo positivo; VPN; valor predictivo negativo; ml, mililitro; UI, Unidades internacionales. Se han tomado como referencia los puntos de corte o *cut-off* proporcionados por Vircell para plasma.

### **Comparativa de los resultados de inmunización en DBS vs. plasma en los 42 pacientes pediátricos con muestras pareadas**

Empleando plasma previamente, pudimos evaluar el porcentaje de los 42 niños y adolescentes del RDC en estudio con IgG protectoras frente a las 6 enfermedades prevenibles por vacunación (**Fig. 5.1**). Sin embargo, cuando comparamos el porcentaje de inmunizados empleando los 42 DBS pareados, los niveles de inmunización frente a los 6 patógenos estudiados varió según el *cut-off* considerado (**Fig. 5.2**). Así, tomando como *gold standard* los resultados en plasma (**opción A en Fig. 5.2**) y empleando en DBS el mismo *cut-off* que en plasma, observamos que el porcentaje de niños inmunizados fue significativamente mayor cuando empleamos DBS, observando los siguientes incrementos para cada patógeno: +2,4% (tosferina), +4,8% (rubeola), +9,5% (tétanos, sarampión) y +28,6%; (paperas y difteria) (**opción B en Fig. 5.2**).

Cuando usábamos DBS y considerábamos el *cut-off* calculado que proporcionaba máxima (100%) especificidad (0% falsos positivos), con el fin de garantizar que todos los pacientes identificados como inmunizados realmente estuvieran protegidos, encontramos una infraestimación (entre 2 y 3 veces menores) de la tasa de protegidos para 5 de los patógenos, excepto para tosferina, donde encontramos el mismo número de niños protegidos. Las menores reducciones en la tasa de protegidos empleando DBS para medir los IgG protectoras se vieron para tétanos (-4,7%) y sarampión (-28,6%), y las mayores para difteria (-45,2%), paperas (-42,9%) y rubeola (-50%) (**opción C en Fig. 5.2**).

Cuando consideramos el *cut-off* más óptimo de especificidad y sensibilidad en los ensayos con DBS (**opción D en Fig. 5.2**), el porcentaje de inmunizados entre esos 42 niños fue diferente en DBS con respecto al plasma para todos los patógenos, excepto para tosferina, que resultó ser igual. Así, el número de pacientes protegidos reportado cuando empleábamos DBS fue menor que cuando usábamos plasma frente a paperas (-23,8%), sarampión (-23,8%), y difteria (-35,7%). La excepción la encontramos para tétanos, donde se observó un 2,4% más de niños inmunizados empleando DBS.

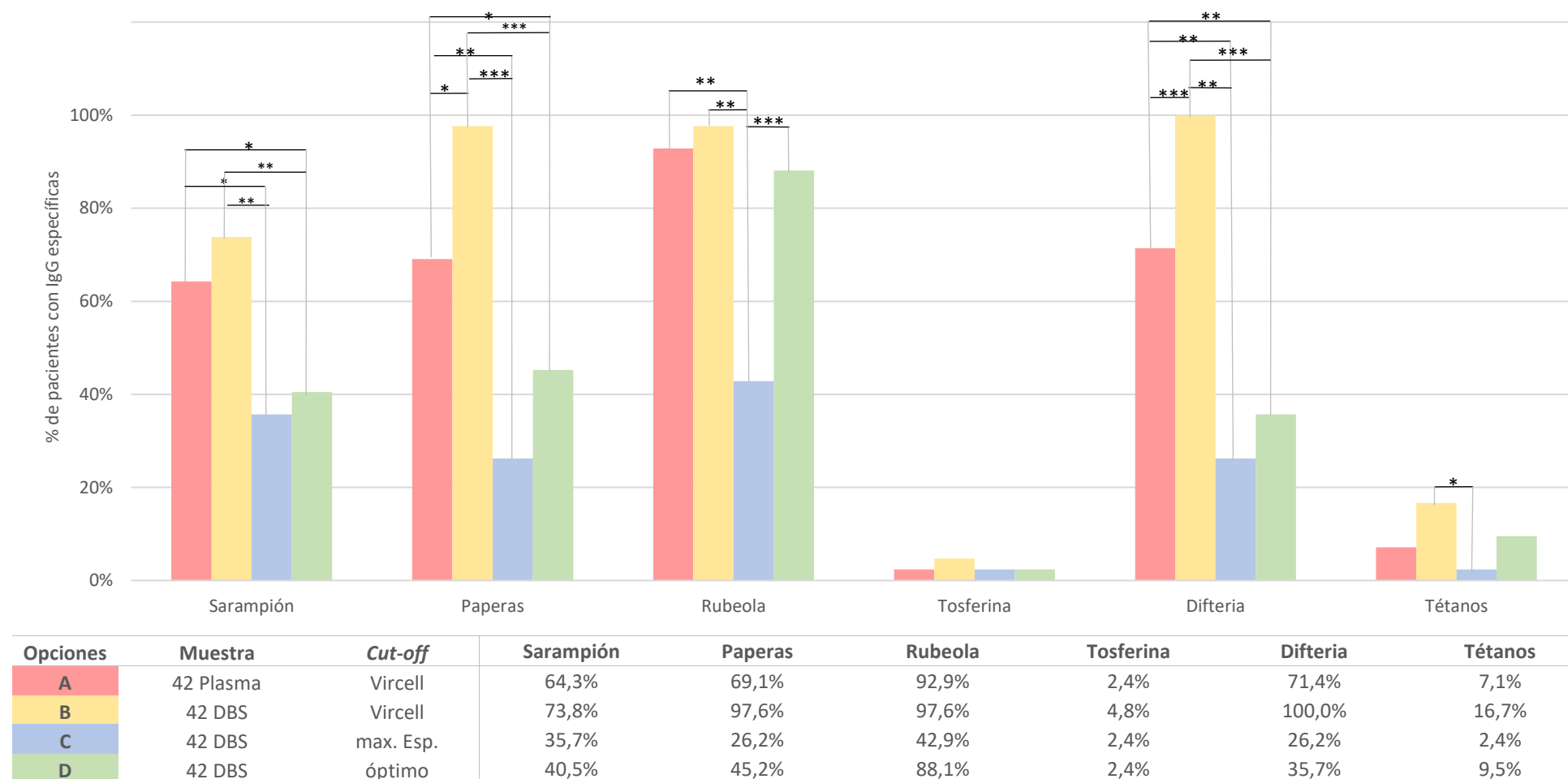
### **Nivel de inmunización estimado en DBS de 143 adolescentes y niños**

Por otro lado, disponíamos de muestras de DBS de otros 101 niños y adolescentes de Kinshasa sin plasma disponible. Por ello, y dado que no teníamos datos de vacunación en esta población, quisimos evaluar el porcentaje de los que tenían IgG protectoras

frente a cada patógeno empleando DBS. Para ello descartamos la opción B (mismo *cut-off* de plasma), ya que sobreestimaba el porcentaje de inmunizados para todos los patógenos (**Fig. 5.2**). Consideramos que para ver el grado de protección en la cohorte completa empleando los 143 DBS disponibles la mejor opción era tomar el *cut-off* con una especificidad del 100% (**opción C** en **Fig. 5.2**). Así, teóricamente, no sobreestimaríamos nunca el porcentaje de pacientes inmunizados, aunque éramos conscientes de que podríamos infraestimar el porcentaje de inmunización en esta cohorte de estudio al no estar asociados esos *cut-off* empleados para cada patógeno a una máxima sensibilidad.

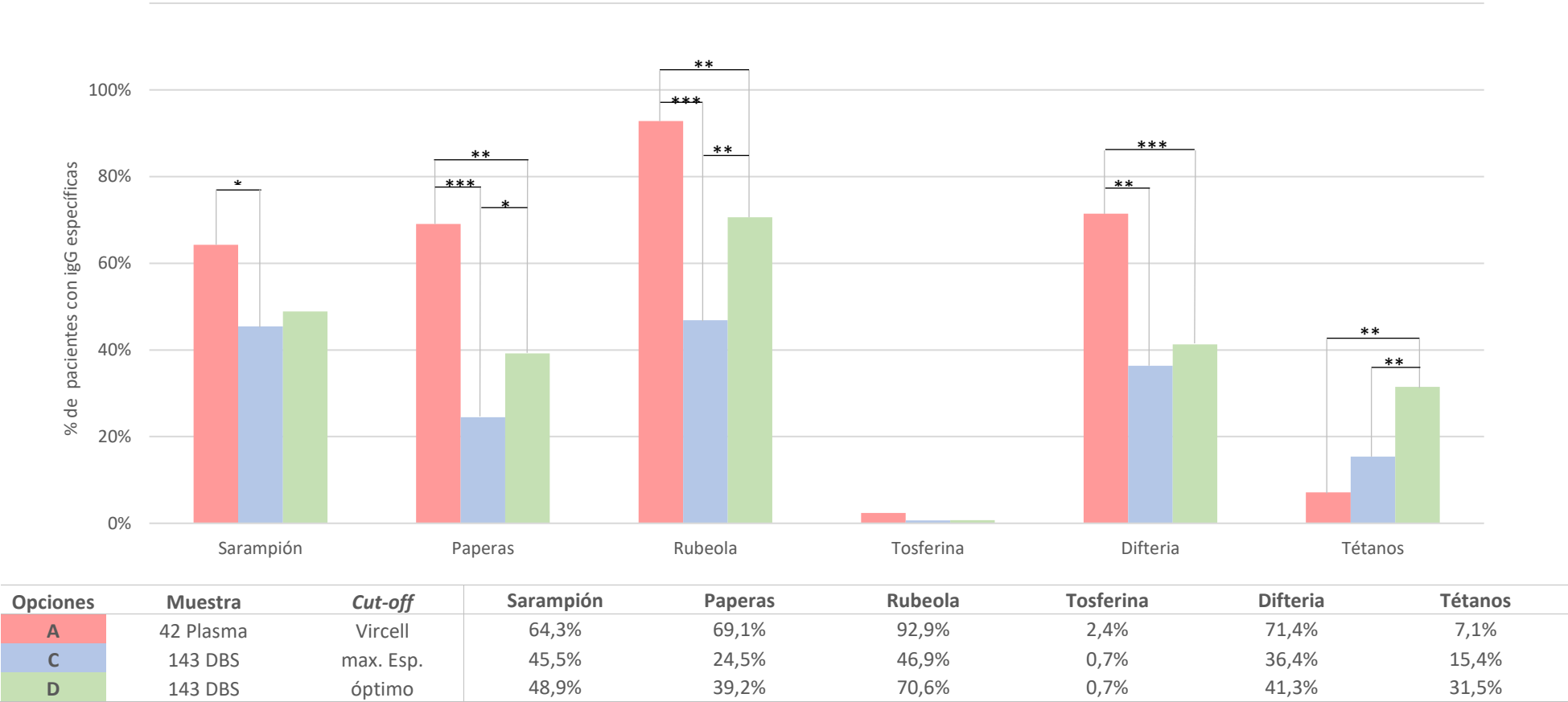
Con este *cut-off* de máxima especificidad analizamos los DBS de los 143 pacientes de este estudio piloto, detectando IgG protectoras en menos de la mitad de ellos: 46,9% para rubeola, 45,5% para sarampión y 36,4% para difteria y estando menos niños inmunizados frente a paperas (24,5%), tétanos (15,4%) y tosferina (0,7%). Como se esperaba, estos valores fueron significativamente inferiores a los resultados obtenidos con plasma (muestra de referencia) y el *cut-off* recomendado por el fabricante (**Tabla II.2** y **Fig. 5.3**), excepto para tétanos, donde se duplicó el porcentaje de inmunizados comparando datos de los 143 DBS vs. 42 plasmas (15,4% vs. 7,1%).

Por tanto, excepto para tétanos, las tasas de inmunización en los 143 pacientes analizados empleando DBS fueron entre 2 y 3 veces menores que las observadas en los 42 plasmas, tal y como ocurría con los valores de inmunización obtenidos comparando los 42 DBS vs. 42 plasmas pareados con los *cut-off* de máx. especificidad en esta pequeña cohorte de estudio (**Fig. 5.2**).

**Figura 5.2. Porcentaje de inmunización en 42 niños con muestras pareadas (plasma y DBS) considerando distintos *cut-off*.**

**Leyenda Fig. 5.2.** El *cut-off* del plasma proporcionado por la casa comercial VirCell para cada patógeno, se muestra en la **Tabla II.2**. El *cut-off* optimo o de máxima especificidad calculado para cada patógeno está indicado en la **Tabla 5.2**. Diferencias estadísticamente significativas encontradas: \* $p=0,01-0,02$ ; \*\*  $p=0,001-0,002$ , \*\*\* $p<0,0001$ .

**Figura 5.3. Comparativa de porcentaje de inmunización en la población de estudio en 42 plasmas vs. 143 DBS, tomando los *cut-off* de máx. especificidad y óptimo.**



**Leyenda Fig. 5.3:** El *cut-off* del plasma proporcionado por la casa comercial VirCell para cada patógeno, se muestra en la **Tabla II.2**. El *cut-off* optimo o de máxima especificidad calculado para cada patógeno está indicado en la **Tabla 5.2**. Diferencias estadísticamente significativas encontradas: \* $p=0,01-0,03$ ; \*\*  $p=0,001-0,0003$ ; \*\*\* $p<0,0001$ .



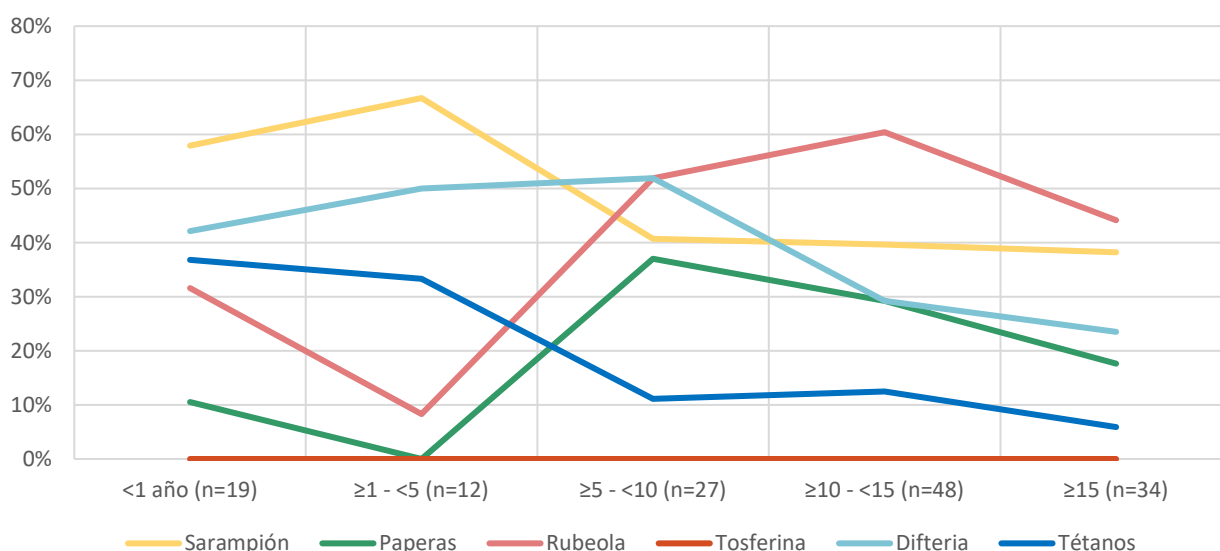
### Inmunización de la población de estudio según edad

Posteriormente analizamos la inmunización frente a cada patógeno según la edad de los 140 pacientes de estudio, con datos de edad conocida, empleando DBS y el *cut-off* de máxima especificidad. Así observamos el siguiente porcentaje de niños menores de 1 año inmunizados: sarampión (57,9%), difteria (42,1%), tétanos (36,8%), rubeola (31,6%), paperas (10,5%) y tosferina (0%), aumentando ligeramente la inmunización en niños de entre 1-5 años para sarampión y difteria, pero disminuyendo para tétanos, rubeola y paperas. Ninguno de los 140 niños y adolescentes con edad conocida tenía IgG frente a tosferina.

Además, observamos una disminución progresiva de la inmunización a medida que aumentaba la edad comparando menores de 5 años con mayores de 15 frente al sarampión (61,3% vs. 38,2%), tétanos (35,5% vs. 5,9%) o cuando comparábamos menores de 10 años con mayores de 15 años para difteria (48,3% vs. 23,5%) y paperas (20,7% vs. 17,6%).

Los mayores niveles de inmunización para tétanos se alcanzaron en bebés menores de 1 año (36,8%), para sarampión en niños de 1 a 5 años (66,7%), para paperas y difteria en niños de 5 a 10 años de edad (37% y 51,9%, respectivamente), y para rubeola en el grupo de 10 a 15 años (60,4%) (Fig. 5.4). Aplicando el *cut-off* óptimo según la **Tabla 5.2**, observamos tendencias similares (datos no mostrados).

**Figura 5.4. Presencia de IgG protectoras en 140 pacientes con DBS según rango de edad empleando el *cut-off* de máxima especificidad.**



\*3 niños sin datos de edad

### Presencia de IgG protectoras frente a los 6 patógenos vacunables en niños con VIH de la cohorte de estudio

Para ver posibles diferencias en cuanto a respuesta del sistema inmune frente a la vacunación y/o exposición a estos 6 patógenos en función de la presencia o ausencia de infección por VIH, procedimos a ver el porcentaje de niños con IgG protectoras en cada grupo dentro de nuestra cohorte.

Entre los 143 pacientes de nuestra cohorte de estudio, 52 (36,4%) vivían con VIH. De ellos, 38 tenían muestras pareadas de plasma/DBS y 14 solo DBS (**Tabla 5.1**). La **Tabla 5.3** muestra el número de pacientes inmunizados según su estadio VIH entre los 42 con plasma disponible. Debido al bajo número de muestras analizadas y de pacientes sin infectar vs. infectados (4 vs. 38), no observamos diferencias estadísticamente significativas en los niveles de IgG estudiados.

**Tabla 5.3. Número de pacientes inmunizados según su estadio VIH entre los 42 con plasma disponible.**

	TOSFERINA	DIFTERIA	SARAMPIÓN	PAPERAS	RUBEOLA	TÉTANOS	TOTAL
<b>VIH+</b>	0 (0%)	26 (68,4%)	23 (60,5%)	25 (65,8%)	35 (92,1%)	3 (7,9%)	38
<b>VIH-</b>	1 (25%)	4 (100%)	4 (100%)	4 (100%)	4 (100%)	0 (0%)	4
<b>p-valor</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	

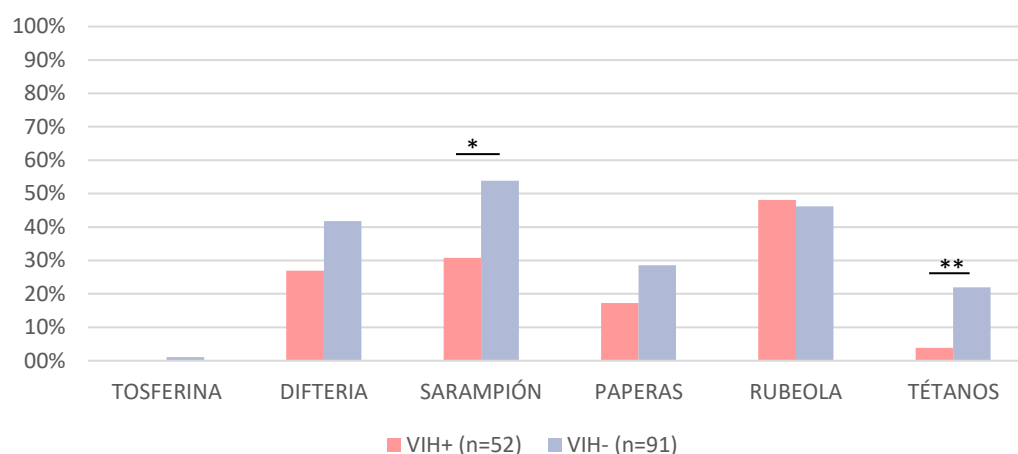
ns, no significativo

Con el fin de aumentar el tamaño muestral y analizar el posible efecto de la infección por VIH en el grado de inmunización, realizamos el mismo análisis empleando los 143 DBS con el *cut-off* de máxima especificidad (**Fig. 5.5A**). Así observamos que el porcentaje de niños inmunizados frente a los 6 patógenos fue inferior en el grupo de infectados por VIH que en el de los no infectados, excepto para rubeola, que fue ligeramente superior. Las diferencias fueron estadísticamente significativas para sarampión (30,8% vs. 53,8%,  $p=0,008$ ) y para tétanos (3,8% vs. 22%,  $p=0,004$ ).

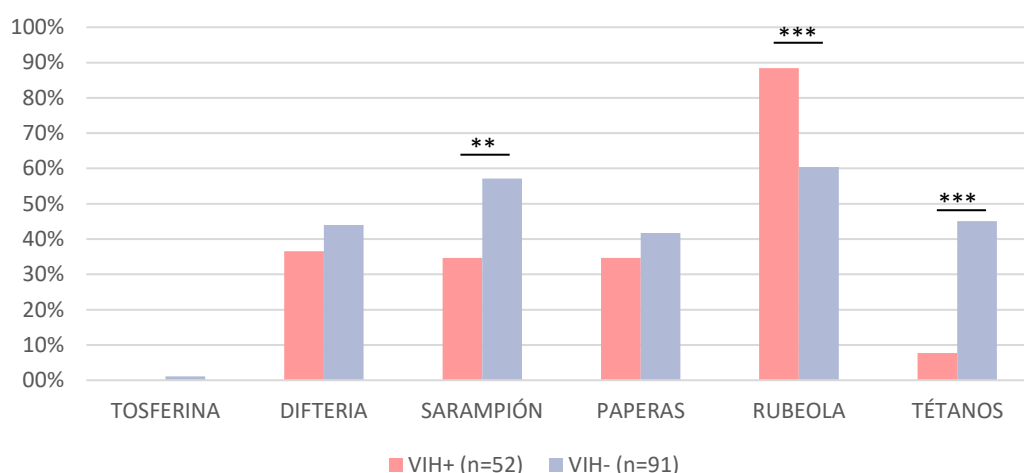
Cuando se aplicó el *cut-off* óptimo para cada patógeno reflejado en la **Figura 5.5B**, observamos que se mantuvieron las diferencias significativas entre infectados y no infectados por VIH en sarampión (34,6% vs. 57,1%,  $p=0,001$ ) y tétanos (7,7% vs. 45,1%,  $p=0,0001$ ). Sin embargo, también se observó una diferencia significativa para rubeola (88,5% vs. 60,4%,  $p=0,0001$ ) que no se daba con *cut-off* de máxima especificidad.

**Figura 5.5. Porcentaje de pacientes inmunizados frente a los 6 patógenos según la infección o no con VIH en los 143 niños y adolescentes empleando DBS y cut-off de máxima especificidad (A) y óptimo (B).**

**A**



**B**



**Leyenda Fig. 5.5.** VIH+, pacientes infectados por VIH; VIH-, pacientes sin infección por VIH. Con asteriscos, diferencias estadísticamente significativas encontradas: \*\* $p=0,001$ , \*\*\* $p=0,0001$ .

## DISCUSIÓN

La evaluación de los programas de inmunización es clave para identificar áreas de cobertura de vacunación subóptima, monitorizar las actividades y ayudar al desarrollo de la política de salud pública<sup>338</sup>. Nuestro estudio piloto pretende aportar datos para visibilizar el grado de protección actual de niños y adolescentes de RDC, teniendo en cuenta la presencia y nivel de IgG protectoras frente a 6 enfermedades infecciosas prevenibles por vacunación. En el calendario vacunal actual de RDC se recomienda

vacunar a los niños durante el primer año de vida frente a tuberculosis, difteria, tétanos, tosferina, polio, fiebre amarilla, hepatitis B, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, rotavirus y rubeola (**Fig. I.15**)<sup>182</sup>.

Es importante señalar que, dado que no disponíamos de los datos de vacunación en nuestra cohorte de estudio, nuestros datos no podrían diferenciar entre los niños y adolescentes que tenían protección debido a la vacunación de aquellos que adquirieron las IgG protectoras por haber pasado la enfermedad. De hecho, no había información ni en las hojas clínicas asociadas a las muestras, ni en sus historiales en RDC, según la información suministrada por los clínicos locales.

Ya que las infecciones virales como sarampión, paperas o rubeola tienen un número de reproducción muy alto (7-12), resulta necesario tener coberturas vacunales muy elevadas para su control<sup>339,340</sup>. Así, para el sarampión, endémico en RDC, se requiere una inmunidad colectiva del 89-94% para detener su transmisión. Estas coberturas requeridas para la eliminación de la enfermedad no se alcanzan en gran parte de los países africanos<sup>341</sup>.

Entre los 42 niños y adolescentes de Kinshasa con plasma disponible, encontramos que 7 de cada 10 estaban inmunizados frente a paperas y 6 de cada 10 a sarampión, a pesar de que en RDC no se incluyen ninguna de estas dos vacunas según el calendario vacunal nacional<sup>182</sup> (**Fig. I.15** y **Fig. 5.1**), sugiriendo que todos ellos deberían de haber pasado la enfermedad. Por otro lado, 9 de cada 10 estaban inmunizados frente a rubeola, cuya vacuna se administra a los 9 meses de edad según el calendario vacunal de RDC<sup>182</sup>. Se sabe que los anticuerpos frente al sarampión, paperas y rubeola pueden durar hasta 20 años o, posiblemente, de por vida cuando se administra la vacuna trivalente<sup>342</sup>, aunque puede observarse una disminución de anticuerpos en algunos niños cuando se dan las vacunas por separado<sup>343</sup>. Si bien, la protección inducida por la vacuna triple vírica parece persistir al menos hasta la edad adulta temprana, es necesaria una vigilancia constante de la protección frente a estos patógenos<sup>342</sup>. Además, hay que tener en cuenta que el calendario vacunal vigente durante el primer año de vida de los adolescentes incluidos en el estudio podría diferir del actual, impactando en la protección frente a algunos de los patógenos en los pacientes de mayor edad.

Nuestros datos revelaron que un 64,2% de los 42 niños con plasma disponible tomados entre los años 2017-2018 tenían protección frente a sarampión (**Fig. 5.1**), casi el mismo porcentaje que el 64% de seroprotección encontrado en 6.706 niños de 6 a 59 meses de edad en muestras de 2013-2014 en RDC<sup>344</sup> y ligeramente superior al de cobertura vacunal de la primera y única dosis de la vacuna contra el sarampión administrada a los 9 meses de edad según indica la OMS (57%)<sup>345</sup>. Esta mayor protección podría deberse, en parte, a una inmunización natural al contraer la enfermedad, y no necesariamente a la vacunación.

El otro dato del que se dispone en RDC es la cobertura de la tercera dosis de la vacuna DTP, que es utilizada como un indicador de la capacidad de un país para proporcionar servicios de inmunización y que, según datos oficiales, también alcanzó el 57% en 2019<sup>345</sup>. En nuestra población, la inmunización frente a esas 3 enfermedades infecciosas en los 42 pacientes con plasma resultó ser muy distinta para cada patógeno. Así, mientras que el 71,4% de los 42 pacientes estaba inmunizado frente a difteria, solo el 7,1% de ellos tenía IgG protectoras frente al tétanos y el 2,4% frente a tosferina, a pesar de que la vacuna DTP está dirigida frente a los 3 patógenos que causan esas enfermedades. Carecemos de datos suficientes en sus historias clínicas para saber si los niños y adolescentes con protección frente a difteria habían sufrido la enfermedad.

En cuanto a la utilización de DBS, estudios previos consideran útiles el uso de DBS para análisis de seroprevalencia en áreas de recursos limitados frente a varios patógenos, como los causantes de hepatitis<sup>346,347</sup>, varicela-zoster<sup>348</sup>, sarampión<sup>348-350</sup>, paperas y rubeola<sup>348,351,352</sup>, entre otros. En este estudio quisimos ver, por primera vez, la utilidad de los DBS para detectar la presencia de IgG frente a difteria, tosferina, sarampión, paperas, tétanos y rubeola usando la técnica Vircell. Para ello, ajustamos los *cut-off* indicados por la técnica para su uso en plasma/suero, algo que habíamos visto esencial para otros patógenos y test previamente en el grupo<sup>353</sup>. Este *cut-off* que seleccionamos para DBS fue el que proporcionaba una especificidad del 100%, ya que nos interesaba conocer el mínimo número de pacientes con protección a las distintas enfermedades vacunables. Además, usando este *cut-off* se minimizaría el porcentaje de falsos positivos para no sobreestimar el porcentaje de inmunizados y poder valorar mejor las necesidades de cobertura vacunal de estas infecciones en el país. Sin embargo,

aceptamos el riesgo o limitación de poder tener valores de protección infraestimados por usar un *cut-off* no siempre asociado a la máxima sensibilidad. Excepto para tétanos, las tasas de inmunización empleando DBS y los *cut-off* de máxima especificidad en esta pequeña cohorte de estudio fueron entre 2 y 3 veces menores que las observadas en plasmas.

Por lo tanto, en este estudio mostramos que, en ausencia de plasma o suero, los DBS se pueden utilizar para estudiar la seroprevalencia frente a patógenos vacunables con una sensibilidad y/o especificidad aceptable (según las necesidades clínicas), siempre y cuando se optimice el valor de corte para cada patógeno. Además, la toma de DBS es más fácil que la de sangre total, plasma o suero para estudios de vigilancia o detección a gran escala en los países de recursos limitados<sup>338,354</sup>. La recolección de DBS es una práctica común, dado que su toma es mínimamente invasiva, reduce costes, requiere menos cadena de frío y puede ser mejor aceptado por el paciente y/o padres o tutores legales en el caso de niños.

Según el calendario vacunal de RDC<sup>182</sup>, las vacunas de las enfermedades analizadas en este trabajo deberían haberse administrado antes del año de edad, excepto para paperas y sarampión. En niños menores de 1 año la exposición a patógenos se presupone inferior que en niños de mayor edad. Podríamos inferir, aunque no sin margen de error, que la protección observada se debería a la vacunación en este grupo de edad. Sin embargo, cuando la inmunidad aumenta en niños de mayor edad o supera el porcentaje de inmunización encontrado en los menores de 1 año, podríamos pensar que es debido a haber superados dicha enfermedad, como ocurre para paperas o rubeola. Por el contrario, si la inmunidad disminuye con la edad, se puede deber a la pérdida de protección de la vacuna con el tiempo. Así vimos que se perdía protección frente al tétanos y sarampión a partir de los 5 años de edad (**Fig. 5.4**), ya que 6 de cada 10 niños menores de 1 año estaban inmunizados frente al sarampión, y solo 4 de cada 10 mayores de 15 años. Ello podría explicar la alta tasa de mortalidad pediátrica por sarampión en el país. En 2019 el 47,3% de las 6.607 muertes por sarampión en RDC ocurrió en menores de 5 años<sup>178</sup>. Esta población, junto con los adultos mayores de 20, embarazadas y personas con sistema inmune debilitado, es la que tiene más probabilidades de sufrir complicaciones por el sarampión<sup>355</sup>.

La pérdida de la inmunidad adquirida mediante la vacunación con el paso del tiempo, ha sido una de las posibles causas, aunque no la única, de la reemergencia de la tosferina. Meta-análisis previos han estimado en unos 3 años la duración media de la protección tras la vacunación con DTP, y solo el 10 % de los niños estarían protegidos a los 8,5 años después de la última dosis<sup>356</sup>. Otro estudio en una cohorte pediátrica de Reino Unido observó que 5 años tras la vacunación, las respuestas de los anticuerpos frente a la tosferina fueron indetectables en el 49% de los niños, y se predijo que estas respuestas indetectables aumentarían hasta un 69% a los 13-14 años de edad<sup>357</sup>. La mediana de edad de nuestra población de estudio fue de 11 años, por lo que no podemos descartar un mayor mantenimiento de niveles de IgG frente a difteria con respecto a las IgG frente a tétanos y tosferina. Esto explicaría un mayor porcentaje de pacientes seroprotegidos frente a difteria vs. tétanos/tosferina en nuestro estudio (71,4% vs. 7,1%/2,4%).

La alta vulnerabilidad a la tosferina y al tétanos de la población infantil y adolescente congoleña del estudio, debido al bajo nivel de seroprotección observado frente a ambas enfermedades infecciosas, es congruente con los datos oficiales del país de 2019, donde 4.587 muertes infantiles se debieron a tosferina, un 91,7% de ellas en menores de 5 años, y 506 muertes a tétanos, 274 de ellas en menores de 5 años<sup>178</sup>. En cuanto a la falta de seroprotección frente a las enfermedades como el sarampión, podría deberse a la falta de vacunación, vacunación incompleta por falta de administración de alguna de las dosis, pérdida de la integridad de la vacuna por roturas en la cadena de frío u otros medios, falta de una respuesta inmune efectiva por factores genéticos del huésped, o por la interferencia de otras infecciones entre otros factores<sup>358–363</sup>.

Con respecto a ese último punto, quisimos analizar el impacto de la infección por VIH en los niveles de seroprotección frente a estos 6 patógenos vacunables en nuestra cohorte de estudio de Kinshasa. Sin embargo, éramos conscientes de que el bajo tamaño muestral (42 pacientes con plasma disponible) y el distinto número de infectados vs. no infectados con cada patógeno limitaría la robustez estadística de los resultados obtenidos, como realmente ocurrió. Por eso procedimos a hacer el análisis también empleando DBS para aumentar el tamaño muestral, por lo que dispusimos de datos de 143 niños y adolescentes.

Hay que tener en cuenta que cuando se quiere ver la tasa de protección frente a un patógeno en una población infantil lo que más interesa es tener valores reales de inmunización y que todos los niños identificados como protegidos realmente lo estén (0% de falsos positivos). Por eso empleamos el *cut-off* o punto de corte con máxima especificidad (100%) de detección de IgG protectoras en nuestra cohorte de estudio a partir de muestras DBS, garantizando la ausencia de falsos positivos. Estos *cut-off* fueron calculados con muestras pareadas plasma/DBS de la misma cohorte de estudio (**Tabla 5.2**). Sin embargo, es importante señalar que el *cut-off* en DBS para cada patógeno debe ser calculado en cada población de estudio con muestras pareadas y no se podrían extrapolar a otras poblaciones, salvo que tengan prevalencias similares para cada infección analizada.

Como mostramos anteriormente, entre los 143 pacientes con DBS disponibles y empleando *cut-off* que daba 100% de especificidad, los niveles de seroprotección en los 52 pacientes infectados con VIH fueron menores que los observados en los 91 niños no infectados para todas las IgG analizada, excepto para rubeola. Una hipótesis podría ser que la inmunización reducida frente a los patógenos en pacientes con VIH pudiera estar influenciada por la menor capacidad observada en niños con VIH de mantener los títulos de anticuerpos a niveles adecuados en el tiempo, como veíamos en **Introducción**<sup>184–187</sup>.

Como también se comentaba en **Introducción**, la protección proporcionada por las vacunas en infectados por VIH es menor que la de las personas inmunocompetentes<sup>184</sup>. Estos bajos niveles también puede deberse a una mayor mortalidad de los niños con VIH y enfermedades concomitantes. Los resultados de nuestra cohorte al comparar la inmunización entre infectados con VIH y no infectados se corresponde con estas afirmaciones. Excepto en la seroprotección frente a rubeola, que fue ligeramente superior en infectados con VIH tras emplear el *cut-off* de máxima especificidad, alcanzando significación estadística cuando se aplicó el *cut-off* óptimo.

Este estudio cuenta con varias limitaciones. Empleamos muestras remanentes tomadas para otros estudios, por lo que no pudimos disponer de los plasmas de los 143 pacientes. Además, los datos relacionados con el estado de inmunización y el número de dosis recibidas de cada vacuna no estaban disponibles en las hojas de información clínica que disponíamos al momento de toma de muestra para cada paciente. Aunque



se solicitaron para completar el estudio, tampoco pudieron ser rescatadas por los clínicos locales de los hospitales participantes. Por ello, no podemos saber cuál es el porcentaje real de niños y adolescentes con IgG protectoras frente a las distintas enfermedades resultantes de su vacunación y cuál es debido a su exposición a los agentes infecciosos que las producen. Además, aunque los datos con DBS sugieren una menor protección frente a 5 de esos patógenos en niños y adolescentes con VIH (para algunos patógenos con apoyo estadístico), no hemos podido confirmar los datos encontrados por el bajo número de sujetos con plasma disponible<sup>184,186,364</sup>. La prevalencia de la enfermedad en el entorno podría modificar el cálculo del *cut-off*, ya que puede modificar la tasa de falsos positivos en el ensayo serológico<sup>84</sup>.

Debido a que se contó con un bajo número de muestras pareadas plasma/DBS, estos resultados se deben tomar como preliminares y deberían confirmarse en un mayor número de muestras pareadas plasmas/DBS. Ello permitiría una mejor evaluación de la eficacia del DBS para medir el grado de inmunización para cada uno de esos 6 patógenos. Además, el número de muestras positivas y negativas en tosferina, difteria, rubeola y tétanos en nuestra población de estudio fue muy desigual. Por ello, se debería emplear una población que incluya un número similar de personas infectadas y no infectadas por cada patógeno, para ajustar mejor los *cut-off* para DBS. Sin embargo, este es un problema extendido, incluso en la validación de algunos de los test de Virclia empleados. Como se puede observar en sus fichas técnicas, el número de muestras analizadas para el control de calidad por test osciló entre 25-93 para los 6 patógenos, sin especificar cuáles de ellas son positivas y cuales negativas. Esto es debido a que la normativa de validación de las técnicas de diagnóstico *in vitro* comercializadas con el marcado CE [Reglamento (UE) 2017/746 del Parlamento Europeo y del Consejo y Real Decreto 1662/2000], no tienen un número determinado de muestras obligatorias para obtener dicha validación. Sin embargo, las técnicas diagnósticas de otros patógenos como el VIH y la hepatitis sí que están regladas<sup>365</sup>.

Aunque estudios como este abren la puerta a medir marcadores vacunales con DBS, reforzamos la necesidad de optimizar el *cut-off* usado en plasma cuando se quieran usar muestras de sangre seca para estudios de seroprevalencia. Por tanto, es esencial realizar estudios con mayor peso muestral, con datos de vacunación disponibles, número

equitativo de pacientes vacunados y no vacunados y con muestras pareadas plasma/DBS para asignar un valor definitivo de *cut-off* en DBS. Así se garantizaría una máxima especificidad y sensibilidad del test específico empleado. Además, los *cut-off* son específicos de cada ensayo empleado, no pudiendo ser extrapolados a ensayos de otras casas comerciales.

Nuestros resultados podrían ayudar a expandir la detección de anticuerpos para la monitorización de la cobertura del nivel de seroprotección entre niños en entornos con recursos limitados o cuando la recolección de plasma/suero es compleja. También para confirmar si los programas de vacunación se han seguido adecuadamente en el país y para identificar los rangos de edad más vulnerables de la población.

Por otro lado, en este estudio piloto presentamos resultados pioneros de seroprotección en DBS frente a 6 enfermedades prevenibles por vacunación en población pediátrica y adolescente de Kinshasa en RDC durante el periodo 2017-2018. Concluimos que la cobertura de vacunación en nuestra cohorte y, probablemente en todo el país, se debe mejorar urgentemente para evitar muertes infantiles evitables por vacunación, como el reciente brote de sarampión en 2019-2020 que causó la muerte de más de 6.000 niños<sup>181</sup>. Para prevenir brotes futuros, recalamos la urgencia y necesidad de una correcta monitorización sero-epidemiológica periódica de la inmunidad a las enfermedades prevenibles por vacunación a nivel global y principalmente en países de recursos limitados, como RDC.

## DIVULGACIÓN

El trabajo descrito en este capítulo ha sido preparado como dos artículos de investigación:

- Rodríguez-Galet A., Valadés-Alcaraz A., Rubio-Garrido M., Rodríguez-Domínguez M., Galán J.C., Reina G., Ndarabu A., Holguín A. Dried blood use for vaccine-preventable disease IgG detection in limited resource settings. *Pediatric (D1)*. En revisión. Artículo incluido en el **Anexo V**.
- Rodríguez-Galet A., Rubio-Garrido M., Valadés-Alcaraz A., Rodríguez-Domínguez M., Galán J.C., Reina G., Ndarabu A., Holguín A. Prevalence of protective IgG against six vaccineable pathogens in children and adolescents from Kinshasa, in the Democratic Republic of Congo using plasma and DBS. Manuscrito en preparación.

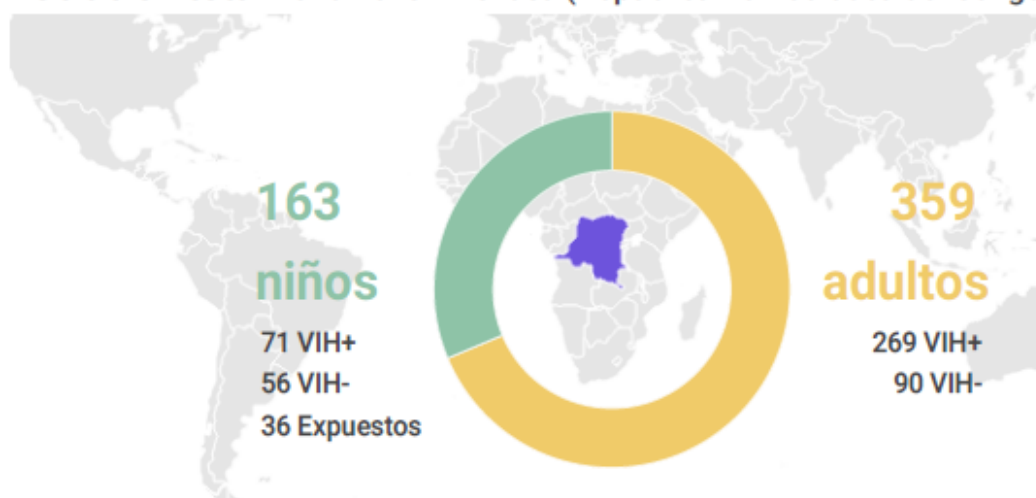
El trabajo fue presentado a los siguientes congresos:

- Poster oral PO-09 en XI Congreso Nacional GeSIDA 2019 (Toledo, España). Rodríguez-Galet A., Valadés-Alcaraz A., Rubio-Garrido M., Rodríguez-Domínguez M., Galán J.C., Reina G., Ndarabu A., Holguín A. *Evaluación de muestras de sangre seca (DBS) para analizar la presencia de marcadores serológicos de enfermedades prevenibles por vacunación en niños VIH+*
- Poster P-085 en XI Congreso Nacional GeSIDA 2019 (Toledo, España). Rodríguez-Galet A., Valadés-Alcaraz A., Rubio-Garrido M., Rodríguez-Domínguez M., Galán J.C., Reina G., Ndarabu A., Holguín A. *Evaluación de la inmunidad a patógenos de las vacunas DTP y Triple Vírica en niños VIH+ de Kinshasa, Republica Democrática del Congo*

# Infografía

# Resultados principales

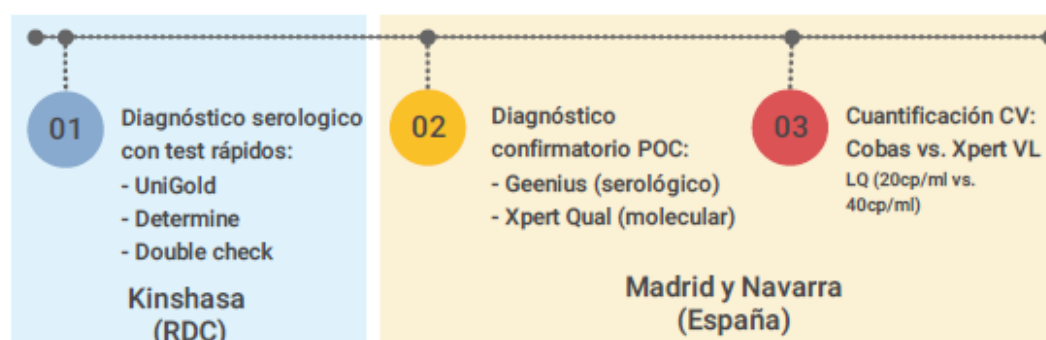
**Población total 2016-2018 Kinshasa (República Democrática del Congo)**



## Población con secuencia *pol*



## Capítulo 1: Diagnóstico del VIH con técnicas *Point-of-Care* (POC)



**Detección de variantes complejas con Xpert Quali y Xpert VL**



**Buena correlación en la cuantificación de la CV entre Xpert VIH VL y Cobas VL Roche**



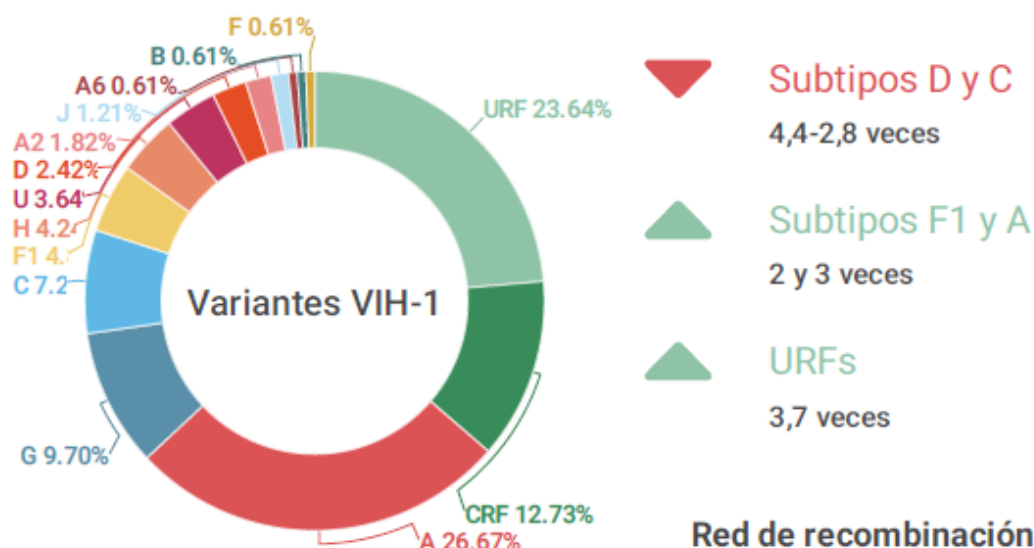
**15,4% de los pacientes tenían diferencias de CV clínicamente significativas**

niños con TAR  
niños sin TAR  
Adultos con TAR



**8 falsos positivos**

## Capítulo 2: Variantes del VIH-1 en población total (165 seq)

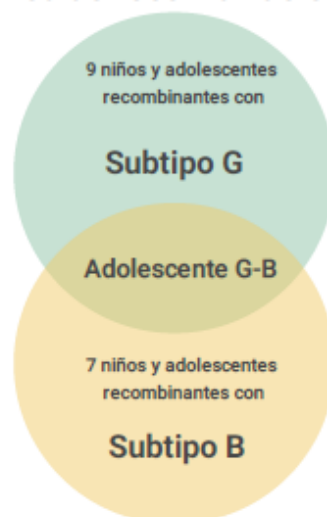


CRF47\_BF identificado por 1ª vez en África

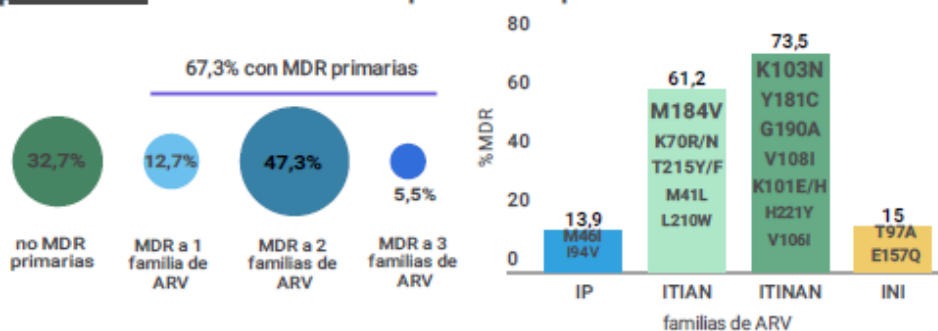
Encontramos 4 clusters de transmisión

Fallo de clasificación del 8,8% LANL sec. A1 y U

### Red de recombinación



## Capítulo 3: Resistencias en población pediátrica



1º análisis de resistencias en niños y adolescentes de RDC

Evitar TAR con ITIAN por altos niveles de resistencia, sobre todo EFV y NVP

Usar TAR basados en IP e INIs

Necesidad de un análisis de resistencias



## Capítulo 4: Marcadores del sistema inmune en niños

### 1 VIH+ vs. Expuestos

Niveles mas elevados de CD14, HVEM en VIH+ que en expuestos

### 2 VIH+ vs. no expuestos

Niveles más elevados en VIH + de CD14, HVEM, B7.1, Siglec-10, HIF-1α y CD163 que en no expuestos

### 3 Expuestos vs. no expuestos

Niveles más elevados de CD14, HVEM, B7.1, Siglec-10, HIF-1α e IRAK-M en expuestos que en no expuestos

### 4 Sin diferencias

B7H5, Galctina 9 y PDL-1

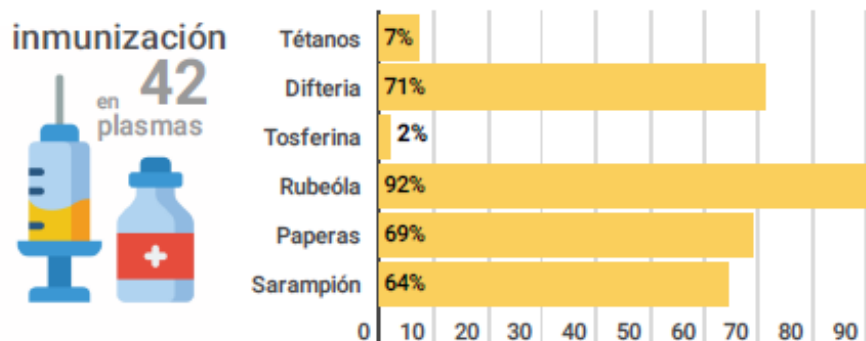
## Conclusiones

Hay diferencias significativas entre el sistema inmune en niños expuestos de los sanos. Presencia de inflamación durante los años de desarrollo.

Utilidad del DBS para cuantificación de ARNm de la expresión del gen.

Integrar el análisis de marcadores del sistema inmune en programas de PTMCT en niños VIH+ y expuestos.

## Capítulo 5: Marcadores vacunales en niños



Niveles elevados de inmunización

Difteria, Rubeola, Paperas y Sarampión



Niveles bajos de inmunización

Tétanos y Tosferina



Uso de DBS

Ajuste de *cut-off*, necesarios más estudios

# Discusión Integradora



El diagnóstico precoz infantil es una de las prioridades de la OMS, ya que permite establecer un TAR temprano, reduce el daño del sistema nervioso central e inmune, los reservorios virales, así como la transmisión del VIH, y la morbi-mortalidad asociadas a la infección por VIH-1. El uso de las técnicas POC puede mejorar el diagnóstico y la monitorización, descentralizando estos servicios y reduciendo el retraso en el diagnóstico y en la identificación de los fallos de tratamiento. Sin embargo, faltan más estudios que evalúen su eficacia en cada una de las variantes del VIH y en los distintos formatos de muestras, incluida la sangre seca. Aún se debe comprender mejor el impacto de la variabilidad genética del VIH en la eficacia de las técnicas POC, evaluando variantes complejas. En esta Tesis se evalúa la utilidad de nuevas técnicas POC para el diagnóstico precoz y la cuantificación de la CV en variantes complejas del VIH-1 usando muestras de DBS de Kinshasa, uno de los entornos geográficos con mayor diversidad de variantes, y donde se originó esta pandemia.

Con este trabajo, detectamos errores diagnósticos en 4 adultos y 4 niños, 5 de ellos estaban recibiendo TAR innecesario al haber recibido un falso diagnóstico de VIH positivo tras emplear pruebas serológicas rápidas en RDC. Además, demostramos que las técnicas POC Xpert-CV y no-POC Roche-CV fueron adecuadas para cuantificar CV usando DBS en un amplio número de variantes no-B del VIH-1. Por lo que podrían emplearse en entornos con gran diversidad de variantes complejas del VIH-1 como es RDC, ya que incluimos en el análisis, por primera vez, un número elevado de recombinantes complejos. Así demostramos que las técnicas utilizadas pueden detectar y cuantificar con éxito recombinantes complejos *pol*. Sin embargo, aunque ambas técnicas mostraban una buena correlación en la cuantificación de la CV, un 15,4% de las muestras presentaron diferencias de viremia clínicamente significativas. Por ello, se deberán realizar futuros estudios en un mayor número de muestras de cada variante del VIH-1 para identificar el impacto de la diversidad genética del VIH-1 en las distintas técnicas con apoyo estadístico. En base a los datos encontrados, también recomendamos ampliar el uso de CV en RDC para una detección temprana del fracaso terapéutico, pero usando siempre la misma técnica para evitar discrepancias, así como reforzar la adherencia y cambiar el régimen del TAR solo si es necesario en base a las resistencias encontradas.

Por todo ello, debido a la simplicidad de las técnicas POC, la rapidez de los resultados y su óptima detección de variantes no-B del VIH, creemos que el uso de la plataforma Xpert de Cepheid para el HIV-1 puede ser muy útil. Ayudaría a la descentralización del diagnóstico molecular precoz infantil (Xpert-Qual) y de la cuantificación de la CV (Xpert-VL) en RDC, acercando estos servicios a hospitales y clínicas locales y mejorando la atención de las personas que viven con VIH.

Tras estudiar las variantes de VIH-1 que circulaban en Kinshasa y en RDC, fuimos conscientes de que la alta diversidad genética del VIH-1 encontrada podría presentar problemas en la correcta identificación de variantes del VIH si no se empleaban análisis filogenéticos profundos. Eso lo demostramos al encontrar un 8,8% de discrepancias al reanalizar secuencias previas de RDC depositadas en LANL, lo cual se pudo aclarar incluyendo en los análisis filogenéticos las nuevas variantes del VIH-1 surgidas en los últimos años y realizando análisis bioinformáticos más precisos. Esto revela la necesidad de revisar y reclasificar las secuencias previas de las bases de datos con nuevos análisis filogenéticos y secuencias de referencia más actualizadas.

En esta Tesis hemos presentado los datos más recientes relacionados con las variantes de VIH-1 que circulaban en Kinshasa durante el periodo 2016-2018, identificando grupos de transmisión y actualizando los datos de diversidad genética viral. Además, presentamos información única y actualizada sobre las tendencias temporales de los subtipos de VIH-1, CRF y URF en RDC durante un periodo de 43 años (1976-2018) y en Kinshasa desde 1983 a 2018. Entre las múltiples variantes encontradas en nuestra cohorte de estudio en Kinshasa (2016-2018), el subtipo A seguía siendo la variante del VIH-1 más frecuente, y sus recombinantes las variantes más prevalentes. Esta alta presencia puede deberse a que Kinshasa se baraja como el origen de este subtipo A, así como de los subtipos G y F1. La prevalencia del subtipo D, cuyo origen también se asocia a Kinshasa, disminuyó en la ciudad durante 2016-2018. Asimismo encontramos que casi 4 de cada 10 variantes que circulaban en Kinshasa durante los periodos de 1983-2008 y 2016-2018 pertenecían a virus con secuencias recombinantes en *pol*, otra muestra más de la gran heterogeneidad de variantes en la ciudad. Incluso, identificamos nuevas variantes nunca antes descritas en África, como es el caso del

recombinante CRF47\_BF, que puede sugerir una importación del subtipo B a RDC desde España o Brasil.

Por otro lado, la diversidad de los recombinantes varía según la edad de los pacientes de nuestra cohorte, siendo la de los CRF mayor en adultos y la de los URF mayor en niños y adolescentes, sugiriendo que las nuevas variantes que se están generando son cada vez más complejas y desconocidas. Además, usando una estrategia de trazabilidad de fragmentos genéticos, observamos una red de recombinación que involucraba 17 secuencias de niños y adolescentes. Ello confirma el importante papel de la recombinación en la pandemia del VIH y la importancia de la identificación de antepasados comunes para comprender el origen y la propagación de la recombinación del virus. Aunque el impacto biológico y clínico aún no se ha aclarado, cada vez hay más pruebas de que la recombinación ha desempeñado un papel importante en la historia de la pandemia del VIH-1 y en la evolución viral. Nuestro conjunto de secuencias es el más reciente en RDC hasta la fecha y proporciona los datos más extensos sobre niños y adolescentes infectados por VIH en el país. Así, los resultados obtenidos han permitido actualizar el conocimiento de la epidemiología molecular del VIH en RDC. La vigilancia molecular periódica del virus es esencial para conocer la evolución de la epidemia del VIH-1 en cualquier país y así poder rastrear cepas emergentes del VIH, cada vez más complejas y diversas, y su tendencia en el tiempo.

Las secuencias virales de los pacientes pediátricos y adolescentes con VIH de Kinshasa fueron también analizadas para estudiar, por primera vez, las resistencias a ARV en este colectivo del país incluyendo, además, el estudio de MDR a INIs. En el país no está disponible el análisis de resistencias de manera rutinaria y no se han proporcionado nunca datos oficiales. Los cambios en el régimen del TAR están determinados por la disponibilidad de ARV y guiados por sospecha clínica de fracaso terapéutico, y no por la identificación de MDR seleccionadas en el genoma viral. Nuestro estudio reveló que 7 de cada 10 niños y adolescentes con VIH de Kinshasa con secuencias disponibles estaban infectados por virus resistentes, principalmente a ITINAN y a ITIAN. Así, 4 de cada 10 tenían doble resistencia a ITIAN+ITINAN y 1 de cada 10 triple resistencia a ITIAN+ITINAN+IP. La resistencia más común fue frente a EFV y NVP, ambos fármacos de primera línea en el país a pesar de no ser la terapia más recomendada por la OMS. En

cuanto a las MDR frente a INI, solo se encontraron mutaciones secundarias o accesorias. Por ello, tanto los IP como los INI podrían ser una buena alternativa terapéutica en RDC, en sustitución de los ITIAN e ITINAN con alto grado de resistencias. Por otro lado, 1 de cada 3 niños y adolescentes con VIH tratados en Kinshasa presentaron viremia no suprimida en ausencia de virus resistentes, lo que sugiere que este colectivo también requiere apoyo de adherencia al TAR. Estos análisis de resistencia proporcionan información única relacionada con estas poblaciones vulnerables en Kinshasa y en el resto del país, donde casi 3 millones de niños y adolescentes están infectados por VIH sin acceso a CV ni monitorización de resistencias. La alta prevalencia de virus resistentes observada podría comprometer los objetivos 95-95-95 de ONUSIDA para controlar la infección en el país. Lo que refuerza la importancia de la monitorización rutinaria y periódica de resistencias para controlar la propagación de variantes resistentes y para una elección óptima de las terapias de rescate tras el fracaso terapéutico, donde los IPs o INIs podrían ser buenos candidatos.

Por otro lado, el conocer el estado inmunológico del paciente es otro aspecto interesante de la monitorización de la infección por VIH, al poder predecir el riesgo de disfunción inmunitaria crónica, especialmente la inflamación persistente, que contribuye a un mayor riesgo de morbilidad y mortalidad entre las personas con VIH. En esta Tesis se aportan datos pioneros sobre la expresión de 10 marcadores inmunes en tres grupos de pacientes pediátricos con o sin infección o exposición al VIH. Además, representa el primer estudio piloto que utiliza DBS en lugar de plasma/suero para medir la expresión génica de marcadores inmunes y de inflamación en niños infectados, expuestos al virus pero sin infectar (hijos de mujer seropositiva) y no expuestos. Encontramos que algunos marcadores inmunes y de inflamación en los niños expuestos por VIH fueron más similares a los de los niños infectados que a los no expuestos, sugiriendo que la exposición al VIH, y no solo la infección, tendrían consecuencias en el estado inmune de los niños. Así identificamos varios biomarcadores con una expresión significativamente mayor en los grupos de niños infectados y expuestos al VIH respecto al grupo de no expuestos. Esa sobreexpresión podría contribuir a un estado de salud alterado relacionada con la inflamación crónica en infectados y expuestos al VIH. La monitorización del perfil inmunológico mediante la cuantificación de biomarcadores

inmunitarios en DBS podría ser interesante para monitorizar la inflamación en los recién nacidos infectados por el VIH, así como en los niños no infectados pero expuestos. Sin embargo, sería interesante confirmar los resultados en cohortes con mayor número de pacientes en cada uno de los 3 grupos de estudio empleando muestras pareadas plasmas/DBS.

Otro tema de interés en la población pediátrica y adolescente de cualquier país es conocer su estado inmune con respecto a enfermedades prevenibles por vacunación, analizando la presencia o ausencia de IgG protectoras frente a enfermedades infecciosas comunes. En esta Tesis medimos el porcentaje de niños y adolescentes con niveles de IgG protectoras en plasma frente a 6 enfermedades prevenibles por vacunación: difteria, tétanos, tosferina, sarampión, paperas y rubeola. Encontramos que la inmunización de la población de estudio fue mayor para rubeola (93%), difteria (72%), paperas (69%) y sarampión (64%) y muy baja para tétanos (7%) y tosferina (2,3%). Los niveles de inmunización frente a sarampión y difteria estaban por encima de la cobertura vacunal del país (57%), lo que parece indicar que parte de la población protegida estudiada puede haber adquirido IgG protectoras por la infección con el patógeno, y no solo mediante la vacunación. Lo contrario ocurre en tétanos y tosferina, donde el bajo grado de población protegida podría deberse a una vacunación insuficiente o a la pérdida de esta inmunidad con la edad, lo que la pone en peligro ante brotes futuros.

Con el fin de hacer estas medidas en DBS, establecimos para cada patógeno los valores de corte para la detección de IgG protectoras que proporcionaban una máxima (100%) especificidad (para no encontrar ningún falso positivo) o los valores más óptimos combinando sensibilidad/especificidad en DBS. Observando la cobertura de vacunación en el país y en nuestro estudio, es evidente que se debe mejorar urgentemente esta cobertura para evitar muertes infantiles evitables. La vacunación es esencial y debe ser una prioridad para la salud pública de cada país y su monitorización seroepidemiológica es fundamental para prevenir futuros brotes y controlar y mejorar los programas de vacunación.

Cabe destacar que todos los resultados de esta Tesis han sido comunicados a los clínicos responsables del seguimiento clínico de los pacientes en estudio para que

puedan tomar decisiones que mejoren su tratamiento y seguimiento de la infección por VIH en RDC. Así hemos transferido conocimiento y divulgado los resultados generados en el ámbito científico y a la sociedad.

Toda esta Tesis se ha llevado a cabo en muestras DBS debido a las facilidades que aporta en cuanto a recolección, almacenamiento y transporte en países como RDC, donde no siempre se dispone de refrigeración fiable, equipamiento para separar plasma/suero o volúmenes de muestra suficiente cuando se trata de niños con desnutrición o bajo peso. Gracias a este formato de muestra, hemos podido evidenciar limitaciones en el diagnóstico y monitorización del VIH y en las campañas de vacunación en RDC. Reflejando así, la necesidad que tiene este país subsahariano, como muchos otros, de reforzar su sanidad pública para controlar la epidemia de VIH y otras enfermedades en niños y adultos.

Con este trabajo queremos reforzar el uso de DBS como muestra alternativa al plasma/suero para estudios de epidemiología molecular, para el diagnóstico precoz infantil con técnicas POC, y también para la monitorización de fracasos terapéuticos, estado del sistema inmune o situación inmunológica frente a otros patógenos vacunables. Con los ajustes necesarios de las técnicas y optimizando procesos, pueden ampliarse mucho sus posibilidades. A partir del DBS se puede extraer material genético del VIH (ARN viral y ADN proviral) o de cualquier patógeno que se encuentre en sangre, lo que nos permite amplificar por PCR cualquier región del genoma del mismo. Ello nos permite detectar variantes o MDR u otros cambios de interés clínico o biológico. Incluso se pueden medir en DBS expresión de genes celulares o de marcadores inmunes como *immunocheckpoints* o marcadores vacunales como hemos mostrado en esta Tesis. Por todo ello, los DBS son una muestra óptima y alternativa que puede ser aplicada a la rutina clínica o en ciencia básica.

# Conclusiones

1. Gracias a las técnicas POC hemos podido detectar falsos positivos en los diagnósticos realizados en RDC en nuestra cohorte de estudio, empleando DBS. Por lo tanto, las técnicas POC pueden mejorar el diagnóstico precoz y la monitorización de la infección, reduciendo fallos en el diagnóstico y detectando precozmente fracasos terapéuticos, para evitar tratamientos innecesarios.
2. La técnica POC cuantitativa evaluada muestra una buena correlación con técnicas cuantitativas convencionales, incluso en entornos con gran diversidad de variantes del VIH-1, como Kinshasa. Sin embargo, las diferencias en la cuantificación de la CV entre técnicas en algunas muestras refuerzan la necesidad de realizar estudios con mayor tamaño muestral para analizar la influencia de la diversidad genética del VIH.
3. Presentamos los datos más recientes de las variantes del VIH-1 que circulaban en Kinshasa durante 2016-2018, identificando grupos de transmisión y actualizando los datos de diversidad genética viral. Además, presentamos información actualizada sobre la tendencia de las variantes del VIH-1 en RDC durante un periodo de 43 años y en Kinshasa de 1983-2018.
4. La diversidad de variantes del VIH-1 en RDC es muy elevada. Así, el 40% de las variantes de nuestra cohorte tenían secuencias recombinantes en *pol* y, de ellos, el 65% eran URF. Por ello, es importante una vigilancia molecular periódica para rastrear variantes emergentes del VIH en el país, y así observar su tendencia en el tiempo.
5. Siete de cada 10 niños y adolescentes con VIH en TAR de Kinshasa con sospecha clínica de fracaso terapéutico estaban infectados por virus resistentes, principalmente a ITINAN y a ITIAN. Observamos que los IP y los INI podrían ser una buena alternativa terapéutica en RDC a los ITINAN.
6. La alta prevalencia de virus resistentes observada podría comprometer los objetivos 95-95-95 de ONUSIDA. Por ello, será muy importante la monitorización periódica futura de resistencias para controlar la propagación de cepas resistentes y la elección más óptima del TAR para cada paciente.



7. Un tercio de los niños y adolescentes con VIH tratados de Kinshasa en estudio presentaron CV no suprimida en ausencia de virus resistentes, lo que sugiere que este colectivo también requiere refuerzo en la adherencia al TAR.
8. En el estudio piloto de marcadores inmunes en niños infectados con VIH, expuestos al virus y no expuestos, algunos marcadores en los expuestos fueron más similares a los de los infectados que a los no expuestos. Esto sugiere que la exposición al VIH tendría consecuencias en el estado inmune de los niños. Estos resultados deberán de ser confirmados en un mayor número de pacientes.
9. Tras medir niveles de IgG protectoras en muestras de plasma disponibles frente a 6 enfermedades prevenibles por vacunación en nuestra población pediátrica y adolescente de Kinshasa, observamos que está muy por debajo de los niveles de inmunización deseados, lo que la hace susceptible ante futuros brotes.
10. Con el fin de medir estos niveles de IgG en DBS, calculamos distintos valores de corte que proporcionan una máxima especificidad y/o sensibilidad para cada patógeno y así extrapolarlo a toda la cohorte.
11. Demostramos que los DBS son útiles como muestra alternativa al plasma/suero para estudios de epidemiología molecular, diagnóstico precoz infantil, y para la monitorización de fracasos terapéuticos, estado del sistema inmune o situación inmunológica frente a otros patógenos vacunables.
12. En RDC, hemos evidenciado limitaciones en el diagnóstico, en la monitorización del VIH y en campañas de vacunación, reflejando la necesidad de reforzar su sanidad pública para controlar la epidemia de VIH y otras enfermedades.
13. Todos los resultados han sido comunicados a los médicos y sanitarios responsables del seguimiento clínico de los pacientes en estudio para que puedan tomar decisiones que mejoren su tratamiento y seguimiento de la infección por VIH y otras infecciones en RDC.

# Bibliografía

1. Barré-Sinoussi, F. *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868–871 (1983).
2. Muesing, M. A. *et al.* Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus. *Nature* **313**, 450–458 (1985).
3. Gallo, R., Wong-Staal, F., Montagnier, L., Haseltine, W. A. & Yoshida, M. HIV/HTLV gene nomenclature. *Nature* **333**, 504 (1988).
4. Emerman, M. & Malim, M. H. HIV-1 regulatory/accessory genes: Keys to unraveling viral and host cell biology. *Science* **280**, 1880–1884 (1998).
5. Levy, J. a. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol. Rev.* **57**, 183–289 (1993).
6. Perelson, A. S., Neumann, A. U., Markowitz, M., Leonard, J. M. & Ho, D. D. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* **271**, 1582–1586 (1996).
7. Jetzt, A. E. *et al.* High rate of recombination throughout the human immunodeficiency virus type 1 genome. *J. Virol.* **74**, 1234–1240 (2000).
8. Zhuang, J. *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 recombination: rate, fidelity, and putative hot spots. *J. Virol.* **76**, 11273–11282 (2002).
9. Ross, H. A. & Rodrigo, A. G. Immune-Mediated Positive Selection Drives Human Immunodeficiency Virus Type 1 Molecular Variation and Predicts Disease Duration. *J. Virol.* **76**, 11715–11720 (2002).
10. Briones, C. & Domingo, E. Minority report: Hidden memory genomes in HIV-1 quasispecies and possible clinical implications. *AIDS Rev.* **10**, 93–109 (2008).
11. Rouet, F. *et al.* Impact of HIV-1 genetic diversity on plasma HIV-1 RNA Quantification: usefulness of the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA second-generation long terminal repeat-based real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction test. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **45**, 380–388 (2007).
12. Geretti, A. M. *et al.* Effect of HIV-1 subtype on virologic and immunologic response to starting highly active antiretroviral therapy. *Clin. Infect. Dis.* **48**, 1296–1305 (2009).
13. Santoro, M. M. & Perno, C. F. HIV-1 Genetic Variability and Clinical Implications. *ISRN Microbiol.* **2013**, 481314 (2013).
14. Clavel, F. *et al.* Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. *Nature* **324**, 691–695 (1986).
15. Robertson, D. L. *et al.* HIV-1 Nomenclature Proposal. *Science* **288**, 55–56 (2000).
16. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). *AIDS by the numbers*. [https://www.unaids.org/sites/default/files/media\\_asset/AIDS-by-the-numbers-2016\\_en.pdf](https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/AIDS-by-the-numbers-2016_en.pdf) (2016).
17. Yamaguchi, J. *et al.* Complete genome sequence of CG-0018a-01 establishes HIV-1 subtype L. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **83**, 319–322 (2020).
18. Visseaux, B., Damond, F., Matheron, S., Descamps, D. & Charpentier, C. HIV-2 molecular epidemiology. *Infect. Genet. Evol.* **46**, 233–240 (2016).
19. Los Alamos HIV Sequence Database. HIV Circulating Recombinant Forms (CRFs). <https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html#CRF01>.
20. Hemelaar, J. *et al.* Global and regional molecular epidemiology of HIV-1, 1990–2015: a systematic review, global survey, and trend analysis. *Lancet Infect. Dis.* **19**, 143–155 (2019).
21. Beloukas, A. *et al.* Molecular epidemiology of HIV-1 infection in Europe: An overview. *Infect. Genet. Evol.* **46**, 180–289 (2016).
22. Frange, P. *et al.* New and old complex recombinant HIV-1 strains among patients with primary infection in 1996–2006 in France: the French ANRS CO06 primo cohort study. *Retrovirology* **5**, 69 (2008).

23. Vercauteren, J. *et al.* Transmission of drug-resistant HIV-1 is stabilizing in Europe. *J. Infect. Dis.* **200**, 1503–1508 (2009).
24. Descamps, D. *et al.* Increasing prevalence of transmitted drug resistance mutations and non-B subtype circulation in antiretroviral-naïve chronically HIV-infected patients from 2001 to 2006/2007 in France. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**, 2620–2627 (2010).
25. Von Wyl, V. *et al.* The role of migration and domestic transmission in the spread of HIV-1 non-B subtypes in Switzerland. *J. Infect. Dis.* **204**, 1095–1103 (2011).
26. Neogi, U. *et al.* Temporal trends in the Swedish HIV-1 epidemic: Increase in non-B subtypes and recombinant forms over three decades. *PLoS One* **9**, e99390 (2014).
27. Holguín, A. *et al.* Genetic characterization of complex inter-recombinant HIV-1 strains circulating in Spain and reliability of distinct rapid subtyping tools. *J. Med. Virol.* **80**, 383–391 (2008).
28. González-Alba, J. M. *et al.* Molecular surveillance of HIV-1 in Madrid, Spain: a phylogeographic analysis. *J. Virol.* **85**, 10755–10763 (2011).
29. Yebra, G. *et al.* Most HIV type 1 non-B infections in the spanish cohort of antiretroviral treatment-naïve HIV-infected Patients (CoRIS) are due to recombinant viruses. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 407–413 (2012).
30. Kwon, E. H. *et al.* HIV-1 subtypes and drug resistance mutations among female sex workers varied in different cities and regions of the Democratic Republic of Congo. *PLoS One* **15**, e0228670 (2020).
31. Aghokeng, A. F. *et al.* Inaccurate diagnosis of HIV-1 group M and O is a key challenge for ongoing universal access to antiretroviral treatment and HIV prevention in Cameroon. *PLoS One* **4**, e7702 (2009).
32. Holguín, A., de Arellano, E. R., Rivas, P. & Soriano, V. Efficacy of antiretroviral therapy in individuals infected with HIV-1 non-B subtypes. *AIDS Rev.* **8**, 98–107 (2006).
33. Gottesman, B. S. *et al.* Measurement of HIV RNA in patients infected by subtype C by assays optimized for subtype B results in an underestimation of the viral load. *J. Med. Virol.* **73**, 167–171 (2004).
34. Holguín, A., López, M., Molinero, M. & Soriano, V. Performance of three commercial viral load assays, versant human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA bDNA v3.0, Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1, and NucliSens HIV-1 EasyQ v1.2, testing HIV-1 non-B subtypes and recombinant variants. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 2918–2923 (2008).
35. Gonzalez, L. M. F. *et al.* In vitro hypersusceptibility of human immunodeficiency virus type 1 subtype C protease to lopinavir. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 2817–2822 (2003).
36. Grossman, Z. *et al.* Mutation D30N is not preferentially selected by human immunodeficiency virus type 1 subtype C in the development of resistance to nelfinavir. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 2159–2165 (2004).
37. Yebra, G., de Mulder, M., del Romero, J., Rodríguez, C. & Holguín, A. HIV-1 non-B subtypes: High transmitted NNRTI-resistance in Spain and impaired genotypic resistance interpretation due to variability. *Antiviral Res.* **85**, 409–417 (2010).
38. Pant Pai, N., Shivkumar, S. & Cajas, J. M. Does genetic diversity of HIV-1 non-B subtypes differentially impact disease progression in treatment-naïve HIV-1-infected individuals? A systematic review of evidence: 1996-2010. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **59**, 382–388 (2012).
39. Korber, B. & Gnanakaran, S. The implications of patterns in HIV diversity for neutralizing antibody induction and susceptibility. *Curr. Opin. HIV AIDS* **4**, 408–417 (2009).
40. Barouch, D. H. Challenges in the development of an HIV-1 vaccine. *Nature* **455**, 613–619 (2008).
41. deCamp, A. *et al.* Global panel of HIV-1 Env reference strains for standardized assessments of vaccine-elicited neutralizing antibodies. *J. Virol.* **88**, 2489–2507 (2014).
42. Baeten, J. M. M. *et al.* HIV-1 subtype D infection is associated with faster disease progression than subtype A in spite of similar plasma HIV-1 loads. *J. Infect. Dis.* **195**, 1177–1180 (2007).
43. Kouri, V. *et al.* CRF19-CPX is an evolutionary fit HIV-1 variant exclusively associated with rapid

- progression to AIDS in Cuba. *EBioMedicine* **2**, 244–254 (2015).
44. Kiwanuka, N. *et al.* HIV-1 subtypes and differences in heterosexual HIV transmission among HIV-discordant couples in Rakai, Uganda. *AIDS* **23**, 2479–2484 (2009).
  45. Holguín, A., Paxinos, E., Hertogs, K., Womac, C. & Soriano, V. Impact of frequent natural polymorphisms at the protease gene on the in vitro susceptibility to protease inhibitors in HIV-1 non-B subtypes. *J. Clin. Virol.* **31**, 215–220 (2004).
  46. Brenner, B. *et al.* A V106M mutation in HIV-1 clade C viruses exposed to efavirenz confers cross-resistance to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *AIDS* **17**, 1–5 (2003).
  47. Van de Vijver, D., Wensing, A. M. J. & Angarano, G. Differences in the frequency of minor substitutions between HIV-1 subtypes and their potential impact on the genetic barrier for resistance to protease inhibitors. *Antivir. Ther.* **10**, S145 (2005).
  48. Kinomoto, M. *et al.* HIV-1 proteases from drug-naïve west african patients are differentially less susceptible to protease inhibitors. *Clin. Infect. Dis.* **41**, 243–251 (2005).
  49. Santos, A. F. A. *et al.* Effect of natural polymorphisms in the HIV-1 CRF02\_AG protease on protease inhibitor hypersusceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 2719–2725 (2012).
  50. Alvarez, P. *et al.* Evaluation of four commercial virological assays for early infant HIV-1 diagnosis using dried blood specimens. *Pediatr Res* **81**, 80–87 (2017).
  51. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). AIDSinfo. <https://aidsinfo.unaids.org/> (2020).
  52. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). *UNAIDS data 2020*. <https://www.unaids.org/en/resources/documents/2020/unaids-data> (2020).
  53. Liu, S. L. *et al.* Divergent patterns of progression to AIDS after infection from the same source: human immunodeficiency virus type 1 evolution and antiviral responses. *J. Virol.* **71**, 4284–4295 (1997).
  54. Crowell, T. A. & Hatano, H. Clinical outcomes and antiretroviral therapy in ‘elite’ controllers: a review of the literature. *J. virus Erad.* **1**, 72–77 (2015).
  55. Rodríguez-Da Silva, A., Miralles, C., Ocampo, A. & Valverde, D. Prevalence study of the genetic markers associated with slow progression of human immunodeficiency virus type 1 in the Galician population (Northwest of Spain). *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **35**, 104–107 (2015).
  56. Merindol, N. & Berthoux, L. Restriction Factors in HIV-1 Disease Progression. *Curr. HIV Res.* **13**, 448–461 (2015).
  57. European Collaborative Study. Children born to women with HIV-1 infection: natural history and risk of transmission. *Lancet* **337**, 253–260 (1991).
  58. Blanche, S. *et al.* Longitudinal study of 94 symptomatic infants with perinatally acquired human immunodeficiency virus infection. Evidence for a bimodal expression of clinical and biological symptoms. *Am. J. Dis. Child.* **144**, 1210–1215 (1990).
  59. Frederick, T., Mascola, L., Eller, A., Oneil, L. & Byers, B. Progression of human-immunodeficiency-virus disease among infants and children infected perinatally with Human-Immunodeficiency-Virus or through neonatal blood-transfusion. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **13**, 1091–1097 (1994).
  60. Mayaux, M. J. *et al.* Neonatal characteristics in rapidly progressive perinatally acquired HIV-1 disease. The French Pediatric HIV Infection Study Group. *JAMA* **275**, 606–610 (1996).
  61. Tovo, P. A. *et al.* Prognostic factors and survival in children with perinatal HIV-1 infection. The Italian Register for HIV Infections in Children. *Lancet* **339**, 1249–1253 (1992).
  62. Blanche, S. *et al.* Morbidity and mortality in European children vertically infected by HIV-1. The French Pediatric HIV Infection Study Group and European Collaborative Study. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirology* **14**, 442–450 (1997).
  63. Mckinnerjr, R. & Wilfert, C. Growth as a prognostic indicator in children with human immunodeficiency virus infection treated with zidovudine. *J. Pediatr.* **125**, 728–733 (1994).

64. Newell, M. L. *et al.* Mortality of infected and uninfected infants born to HIV-infected mothers in Africa: A pooled analysis. *Lancet* **364**, 1236–1243 (2004).
65. Judd, A. Early antiretroviral therapy in HIV-1-infected infants, 1996-2008: Treatment response and duration of first-line regimens: The European Pregnancy and Paediatric HIV Cohort Collaboration (EPPICC) study group in EuroCoord. *AIDS* **25**, 2279–2287 (2011).
66. Violari, A. *et al.* Early antiretroviral therapy and mortality among HIV-infected infants. *N. Engl. J. Med.* **359**, 2233–2244 (2008).
67. Picat, M. Q. *et al.* Predicting patterns of long-term CD4 reconstitution in HIV-infected children starting antiretroviral therapy in Sub-Saharan Africa: a cohort-based modelling study. *PLoS Med.* **10**, e1001542 (2013).
68. World Health Organization (WHO). *Technical and operational considerations for implementing HIV viral load testing*. <https://www.who.int/hiv/pub/arv/viral-load-testing-technical-update/en/> (2014).
69. World Health Organization (WHO). *WHO recommendations on the diagnosis of HIV infection in infants and children*. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44275> (2010).
70. Bourlet, T., Memmi, M., Saoudin, H. & Pozzetto, B. Molecular HIV screening. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **13**, 693–705 (2013).
71. UNITAID & World Health Organization (WHO). *HIV/AIDS diagnostics technology landscape 5 th edition*. [http://www.unitaid.org/assets/UNITAID\\_HIV\\_Nov\\_2015\\_Dx\\_Landscape-1.pdf](http://www.unitaid.org/assets/UNITAID_HIV_Nov_2015_Dx_Landscape-1.pdf) (2015).
72. Lecher, S. *et al.* Scale-up of HIV viral load monitoring — Seven sub-Saharan African countries. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **64**, 1287–1290 (2015).
73. Roberts, T., Cohn, J., Bonner, K. & Hargreaves, S. Scale-up of routine viral load testing in resource-poor settings: current and future implementation challenges. *Clin. Infect. Dis.* **62**, 1043–1048 (2016).
74. World Health Organization (WHO). *Antiretroviral therapy for HIV infection in adults and adolescents*. <https://www.who.int/hiv/pub/arv/adult2010/en/> (2010).
75. World Health Organization (WHO). *Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection*. <https://www.who.int/hiv/pub/guidelines/arv2013/en/> (2013).
76. World Health Organization (WHO). *March 2014 supplement to the 2013 consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection*. [https://www.who.int/hiv/pub/guidelines/arv2013/arvs2013supplement\\_march2014/en/](https://www.who.int/hiv/pub/guidelines/arv2013/arvs2013supplement_march2014/en/) (2014).
77. Celletti, F., Sherman, G. & Mazanderani, A. H. Early infant diagnosis of HIV: Review of current and innovative practices. *Curr. Opin. HIV AIDS* **12**, 112–116 (2017).
78. Engel, N. & Pant Pai, N. Qualitative research on point-of-care testing strategies and programs for HIV. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **15**, 71–75 (2015).
79. Wu, G., Muhammad, & Zaman, H. Policy & practice Low-cost tools for diagnosing and monitoring HIV infection in low-resource settings. *Bull World Heal. Organ* **90**, 914–920 (2012).
80. Lambert, J. S. *et al.* Performance characteristics of HIV-1 culture and HIV-1 DNA and RNA amplification assays for early diagnosis of perinatal HIV-1 infection. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **34**, 512–519 (2003).
81. Havens, P. L. & Mofenson, L. M. Evaluation and management of the infant exposed to HIV-1 in the United States. *Pediatrics* **123**, 175–187 (2009).
82. Mouinga-Ondémé, A. *et al.* Significant impact of non-B HIV-1 variants genetic diversity in Gabon on plasma HIV-1 RNA quantitation. *J. Med. Virol.* **86**, 52–57 (2014).
83. Margariti, A. *et al.* Comparing Abbott m2000 RealTime HIV test and Roche COBAS Ampliprep/COBAS Taqman HIV test, v2.0 in treated HIV-1 B and non-B subjects with low viraemia. *J. Med. Virol.* **88**, 724–727 (2016).
84. Feucht, U., Forsyth, B. & Kruger, M. False-positive HIV DNA PCR testing of infants: Implications in

- a changing epidemic. *South African Med. J.* **102**, 149–152 (2012).
85. De Mulder, M. & Holguín, A. Dried blood spots for monitoring HIV infection in Public Health Programs in developing countries. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **31**, 100–107 (2013).
  86. Tchiakpe, E. *et al.* Use of dried blood spots in early diagnosis of HIV-1 infection in children born to HIV-infected mothers as part of the prevention of mother-to-child transmission in Benin. *Bull. la Société Pathol. Exot.* **109**, 155–159 (2016).
  87. Su, X. *et al.* Dried blood spots: An evaluation of utility in the field. *J. Infect. Public Health* **11**, 373–376 (2018).
  88. Lofgren, S. M. *et al.* Evaluation of a dried blood spot HIV-1 RNA program for early infant diagnosis and viral load monitoring at rural and remote healthcare facilities. *AIDS* **23**, 2459–2466 (2009).
  89. Rubio-Garrido, M. *et al.* Utility of POC Xpert HIV-1 tests for detection-quantification of complex HIV recombinants using dried blood spots from Kinshasa, D. R. Congo. *Sci. Rep.* **9**, 5679 (2019).
  90. Bertagnolio, S., Parkin, N. T., Jordan, M., Brooks, J. & García-Lerma, J. G. Dried blood spots for HIV-1 drug resistance and viral load testing: A review of current knowledge and WHO efforts for global HIV drug resistance surveillance. *AIDS Rev.* **12**, 195–208 (2010).
  91. World Health Organization (WHO). *Manual for HIV Drug Resistance Testing using Dried Blood Specimens*. [https://www.who.int/hiv/pub/drugresistance/dried\\_blood\\_spots/en/](https://www.who.int/hiv/pub/drugresistance/dried_blood_spots/en/) (2012).
  92. Sherman, G. G., Stevens, G., Jones, S. A., Horsfield, P. & Stevens, W. S. Dried blood spots improve access to HIV diagnosis and care for infants in low-resource settings. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **38**, 615–617 (2005).
  93. Creek, T. *et al.* Early diagnosis of human immunodeficiency virus in infants using polymerase chain reaction on dried blood spots in Botswana's national program for prevention of mother-to-child transmission. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **27**, 22–26 (2008).
  94. Dube, Q. *et al.* Implementing early infant diagnosis of HIV infection at the primary care level: experiences and challenges in Malawi. *Bull. World Health Organ.* **90**, 699–704 (2012).
  95. Yapo, V. *et al.* Evaluation of dried blood spot diagnosis using HIV1-DNA and HIV1-RNA Biocentric assays in infants in Abidjan, Côte d'Ivoire. The Pedi-Test DBS ANRS 12183 Study. *J. Virol. Methods* **193**, 439–445 (2013).
  96. Smit, P. W. *et al.* Systematic review of the use of dried blood spots for monitoring HIV viral load and for early infant diagnosis. *PLoS One* **9**, (2014).
  97. Fernández McPhee, C. *et al.* HIV-1 infection using dried blood spots can be confirmed by Bio-Rad Geenius™ HIV 1/2 confirmatory assay. *J. Clin. Virol.* **63**, 66–69 (2015).
  98. Cassol, S. A. *et al.* Diagnosis and direct automated sequencing of HIV-1 from dried blood spots (DBS) collected on filter paper. *Methods Mol. Med.* **17**, 125–138 (1999).
  99. Neogi, U. *et al.* Dried blood spot HIV-1 RNA quantification: a useful tool for viral load monitoring among HIV-infected individuals in India. *Indian J. Med. Res.* **136**, 956–962 (2012).
  100. Holguín, Á. *et al.* Transmitted drug-resistance in human immunodeficiency virus-infected adult population in El Salvador, Central America. *Clin. Microbiol. Infect.* **19**, 523–532 (2013).
  101. Gueye, S. B. *et al.* Performance of Roche CAP/CTM HIV-1 qualitative test version 2.0 using dried blood spots for early infant diagnosis. *J. Virol. Methods* **229**, 12–15 (2016).
  102. Mutagoma, M. *et al.* Prevalence of transmitted HIV-1 drug resistance among young adults attending HIV counselling and testing clinics in Kigali, Rwanda. *Antivir. Ther.* **21**, 247–251 (2016).
  103. Prieto-Tato, L. M. *et al.* Early diagnosis of human immunodeficiency virus-1 in infants: The prevention of mother-to-child transmission program in Equatorial Guinea. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **34**, 566–570 (2016).
  104. Salou, M. *et al.* High rates of drug resistance among newly diagnosed HIV-infected children in the national prevention of mother-to-child transmission program in Togo. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **35**, 879–885 (2016).



105. Templer, S. P. *et al.* Improved sensitivity of a dual-target HIV-1 qualitative test for plasma and dried blood spots. *J. Clin. Microbiol.* **54**, 1877–1882 (2016).
106. Sawadogo, S. *et al.* Limited utility of dried-blood- and plasma spot-based screening for antiretroviral treatment failure with Cobas Ampliprep/TaqMan HIV-1 version 2.0. *J. Clin. Microbiol.* **52**, 3878–3883 (2014).
107. Brambilla, D. *et al.* Multicenter evaluation of use of dried blood and plasma spot specimens in quantitative assays for human immunodeficiency virus RNA: Measurement, precision, and RNA stability. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 1888–1893 (2003).
108. Leelawiwat, W. *et al.* Dried blood spots for the diagnosis and quantitation of HIV-1: Stability studies and evaluation of sensitivity and specificity for the diagnosis of infant HIV-1 infection in Thailand. *J. Virol. Methods* **155**, 109–117 (2009).
109. Johannessen, A. Dried blood spots in HIV monitoring: applications in resource-limited settings. *Bioanalysis* **2**, 1893–1908 (2010).
110. Johannessen, A. *et al.* HIV type-1 drug resistance testing on dried blood spots is feasible and reliable in patients who fail antiretroviral therapy in rural Tanzania. *Antivir. Ther.* **15**, 1003–1009 (2010).
111. Aitken, S. C., Wallis, C. L., Stevens, W., de Wit, T. R. & Schuurman, R. Stability of HIV-1 nucleic acids in dried blood spot samples for HIV-1 drug resistance genotyping. *PLoS One* **10**, e0131541 (2015).
112. Ford, N. *et al.* Benefits and risks of rapid initiation of antiretroviral therapy. *AIDS* **32**, 17–23 (2018).
113. GeSIDA-SEIMC. *Documento de consenso de GeSIDA: Plan nacional sobre el SIDA respecto al tratamiento antirretroviral en adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana.* [http://gesida-seimc.org/wp-content/uploads/2019/01/gesida\\_DC\\_TAR\\_2019\\_v\\_final.pdf](http://gesida-seimc.org/wp-content/uploads/2019/01/gesida_DC_TAR_2019_v_final.pdf) (2019).
114. World Health Organization (WHO). WHO recommends dolutegravir as preferred HIV treatment option in all populations. <https://www.who.int/news-room/detail/22-07-2019-who-recommends-dolutegravir-as-preferred-hiv-treatment-option-in-all-populations> (2019).
115. Elizabeth Glaser Pediatric AIDS Foundation (EGPAF). Democratic Republic of Congo. <https://www.pedaids.org/country/democratic-republic-congo/> (2010).
116. U.S. President’s Emergency Plan for AIDS Relief (PEPFAR). *Democratic Republic of the Congo Country Operational Plan (COP) 2019 Strategic Direction Summary.* [https://www.state.gov/wp-content/uploads/2019/09/DRC\\_COP19-Strategic-Directional-Summary\\_public.pdf](https://www.state.gov/wp-content/uploads/2019/09/DRC_COP19-Strategic-Directional-Summary_public.pdf) (2019).
117. Programme National Multisectoriel de Lutte contre le Sida (RD Congo). *Plan Stratégique National de la riposte au VIH/Sida 2018-2021 – PNMLS.* [http://www.pnmls.cd/doc/PSN\\_2018\\_-\\_2021.pdf](http://www.pnmls.cd/doc/PSN_2018_-_2021.pdf) (2018).
118. Bennett, D. E., Myatt, M., Bertagnolio, S., Sutherland, D. & Gilks, C. F. Recommendations for surveillance of transmitted HIV drug resistance in countries scaling up antiretroviral treatment. *Antivir. Ther.* **13**, 25–36 (2008).
119. World Health Organization (WHO). *Global Action Plan on HIV Drug Resistance 2017–2021. Combating HIV drug resistance, a little known but growing threat.* [https://www.who.int/hiv/drugresistance/hivdr\\_darft\\_gap.pdf](https://www.who.int/hiv/drugresistance/hivdr_darft_gap.pdf) (2016).
120. Dollfus, C. *et al.* Long-term outcomes in adolescents perinatally infected with HIV-1 and followed up since birth in the french perinatal cohort (EPF/ANRS CO10). *Clin. Infect. Dis.* **51**, 214–224 (2010).
121. Goetghebuer, T. *et al.* Effect of early antiretroviral therapy on the risk of AIDS/death in HIV-infected infants. *AIDS* **23**, 597–604 (2009).
122. Judd, A. *et al.* Morbidity, mortality, and response to treatment by children in the United Kingdom and Ireland with perinatally acquired HIV infection during 1996-2006: planning for teenage and adult care. *Clin. Infect. Dis.* **45**, 918–924 (2007).
123. Sabin, C. Response to combination antiretroviral therapy: Variation by age. *AIDS* **22**, 1463–1473 (2008).
124. Beltrán-Pavez, C. *et al.* Virological outcome among HIV infected patients transferred from



- pediatric care to adult units in Madrid, Spain (1997-2017). *Sci. Rep.* **10**, 16891 (2020).
125. CEVIHP/SEIP/AEP/PNS. *Documento de consenso sobre el tratamiento antirretroviral en niños y adolescentes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana*. [https://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/docconsensotarninosadolescentes\\_para\\_comentarios\\_11abr19.pdf](https://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/docconsensotarninosadolescentes_para_comentarios_11abr19.pdf) (2019).
  126. Wilson, D. *et al.* HIV-1 viral load monitoring: an opportunity to reinforce treatment adherence in a resource-limited setting in Thailand. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **103**, 601–606 (2009).
  127. Bonner, K., Mezocho, A., Roberts, T., Ford, N. & Cohn, J. Viral load monitoring as a tool to reinforce adherence: a systematic review. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **64**, 74–78 (2013).
  128. World Health Organization (WHO). *What's new in monitoring. HIV treatment and care*. [http://catalogue.safaiids.net/sites/default/files/publications/HIV Treatment and Care What is New in Monitoring.pdf](http://catalogue.safaiids.net/sites/default/files/publications/HIV_Treatment_and_Care_What_is_New_in_Monitoring.pdf) (2015).
  129. GeSIDA-SEIMC. *Documento de consenso de GeSIDA sobre control y monitorización de la infección por el VIH*. [http://gesida-seimc.org/wp-content/uploads/2018/02/gesida\\_DC\\_Control\\_Monitorizacion\\_VIH.pdf](http://gesida-seimc.org/wp-content/uploads/2018/02/gesida_DC_Control_Monitorizacion_VIH.pdf) (2018).
  130. Keiser, O. *et al.* Outcomes of antiretroviral treatment in programmes with and without routine viral load monitoring in Southern Africa. *AIDS* **25**, 1761–1769 (2011).
  131. Roberts, T., Bygrave, H., Fajardo, E. & Ford, N. Challenges and opportunities for the implementation of virological testing in resource-limited settings. *J. Int. AIDS Soc.* **15**, 17324 (2012).
  132. Bonner, K. *et al.* Expanding access to HIV viral load testing: A systematic review of RNA stability in EDTA tubes and PPT beyond current time and temperature thresholds. *PLoS One* **9**, (2014).
  133. Kuritzkes, D. R. *et al.* Preexisting resistance to nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitors predicts virologic failure of an efavirenz-based regimen in treatment-naïve HIV-1-infected subjects. *J. Infect. Dis.* **197**, 867–870 (2008).
  134. Llacer, T., Torrecilla, E. & Holguín, Á. Deep analysis of HIV-1 natural variability across HIV-1 variants at residues associated with integrase inhibitor (INI) resistance in INI-naïve individuals. *J. Antimicrob. Chemother.* **71**, 362–366 (2016).
  135. Bennett, D. E. *et al.* Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug-resistance: 2009 update. *PLoS One* **4**, e4724 (2009).
  136. Wensing, A. *et al.* 2019 Update of the drug resistance mutations in HIV-1. *Top. Antivir. Med.* **27**, 111–121 (2019).
  137. Persaud, D. *et al.* Slow human immunodeficiency virus type 1 evolution in viral reservoirs in infants treated with effective antiretroviral therapy. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **23**, 381–390 (2007).
  138. Hirsch, M. S. *et al.* Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection: 2008 recommendations of an International AIDS Society–USA Panel. *Clin. Infect. Dis.* **47**, 266–285 (2008).
  139. Phillips, A. N. *et al.* Impact of HIV drug resistance on HIV/AIDS-associated mortality, new infections, and antiretroviral therapy program costs in Sub-Saharan Africa. *J. Infect. Dis.* **215**, 1362–1365 (2017).
  140. World Health Organization (WHO). *HIV Drug Resistance Report 2019*. <https://www.who.int/hiv/pub/drugresistance/hivdr-report-2019/en/> (2019).
  141. Ngarina, M. *et al.* Virologic and immunologic failure, drug resistance and mortality during the first 24 months postpartum among HIV-infected women initiated on antiretroviral therapy for life in the Mitra plus Study, Dar es Salaam, Tanzania. *BMC Infect. Dis.* **15**, 175 (2015).
  142. World Health Organization (WHO). *Global Action Plan on HIV Drug Resistance 2017-2021*. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255883/9789241512848-eng.pdf> (2017).
  143. Aghokeng, A. F. *et al.* High failure rate of the ViroSeq HIV-1 genotyping system for drug resistance testing in Cameroon, a country with broad HIV-1 genetic diversity. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 1635–

- 1641 (2011).
144. Alvarez, P. *et al.* HIV-1 variability and viral load technique could lead to false positive HIV-1 detection and to erroneous viral quantification in infected specimens. *J. Infect.* **71**, 368–376 (2015).
  145. Tatarelli, P. *et al.* HIV-1 RNA quantification in CRF02\_AG HIV-1 infection: too easy to make mistakes. *New Microbiol.* **39**, 150–152 (2016).
  146. Von Truchsess, I., Harris, B., Schätzl, H. M. & Hackett, J. The first B/G intersubtype recombinant form of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) identified in Germany was undetected or underquantitated by some commercial viral load assays. *J. Med. Virol.* **78**, 311–317 (2006).
  147. Ruelle, J., Jnaoui, K., Lefèvre, I., Lamarti, N. & Goubau, P. Comparative evaluation of the VERSANT® HIV-1 RNA 1.0 kinetic PCR molecular system (kPCR) for the quantification of HIV-1 plasma viral load. *J. Clin. Virol.* **44**, 297–301 (2009).
  148. Troppan, K. T., Stelzl, E., Violan, D., Winkler, M. & Kessler, H. H. Evaluation of the new VERSANT HIV-1 RNA 1.0 Assay (kPCR) for quantitative detection of human immunodeficiency virus type 1 RNA. *J. Clin. Virol.* **46**, 69–74 (2009).
  149. Rouet, F. *et al.* Current challenges to viral load testing in the context of emerging genetic diversity of HIV-1. *Expert Opin. Med. Diagn.* **5**, 183–202 (2011).
  150. Kessler, H. H. *et al.* Genotype impact on HCV RNA levels determined with the VERSANT HCV RNA 1.0 Assay (kPCR). *J. Clin. Virol.* **58**, 522–527 (2013).
  151. Paediatric European Network for Treatment of AIDS (PENTA). HIV-1 viral load and CD4 cell count in untreated children with vertically acquired asymptomatic or mild disease. *AIDS* **12**, F1-8 (1998).
  152. Powderly, W. G., Landay, A. & Lederman, M. M. Recovery of the immune system with antiretroviral therapy: the end of opportunism? *JAMA* **280**, 72–77 (1998).
  153. Kourtis, A. P., Lee, F. K., Abrams, E. J., Jamieson, D. J. & Bulterys, M. Mother-to-child transmission of HIV-1: timing and implications for prevention. *Lancet Infect. Dis.* **6**, 726–732 (2006).
  154. Mofenson, L. M. & McIntyre, J. a. Advances and research directions in the prevention of mother-to-child HIV-1 transmission. *Lancet* **355**, 2237–2244 (2000).
  155. Thorne, C. & Newell, M. L. The safety of antiretroviral drugs in pregnancy. *Expert Opin. Drug Saf.* **4**, 323–335 (2005).
  156. The European Collaborative Study. Maternal viral load and vertical transmission of HIV-1: an important factor but not the only one. *AIDS* **13**, 1377–1385 (1999).
  157. Garcia, P. M. *et al.* Maternal levels of plasma human immunodeficiency virus type 1 RNA and the risk of perinatal transmission. Women and Infants Transmission Study Group. *N Engl J Med* **341**, 394–402 (1999).
  158. United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). *Progress report on the global plan towards the elimination of new infections among children and keeping their mothers alive*. [https://www.unaids.org/sites/default/files/media\\_asset/JC2774\\_2015ProgressReport\\_GlobalPlan\\_en.pdf](https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/JC2774_2015ProgressReport_GlobalPlan_en.pdf) (2015).
  159. De Cock, K. M. *et al.* Prevention of mother-to-child HIV transmission in resource-poor countries: translating research into policy and practice. *JAMA* **283**, 1175–1182 (2000).
  160. Aizire, J., Fowler, M. G. & Coovadia, H. M. Operational issues and barriers to implementation of prevention of mother-to-child transmission of HIV (PMTCT) interventions in Sub-Saharan Africa. *Curr. HIV Res.* **11**, 144–159 (2013).
  161. Wettstein, C. *et al.* Missed opportunities to prevent mother-to-child-transmission: systematic review and meta-analysis. *AIDS* **26**, 2361–2373 (2012).
  162. Evans, C., Humphrey, J. H., Ntozini, R. & Prendergast, A. J. HIV-exposed uninfected infants in Zimbabwe: insights into health outcomes in the pre-antiretroviral therapy Era. *Front. Immunol.* **7**, 190 (2016).
  163. Dirajlal-Fargo, S. *et al.* HIV-exposed-uninfected infants have increased inflammation and

- monocyte activation. *AIDS* **33**, 845–853 (2019).
164. Prendergast, A. J. *et al.* Stunting is characterized by chronic inflammation in zimbabwean infants. *PLoS One* **9**, e86928 (2014).
  165. World Health Organization (WHO). Infant feeding for the prevention of mother-to-child transmission of HIV. [https://www.who.int/elena/titles/hiv\\_infant\\_feeding/en/](https://www.who.int/elena/titles/hiv_infant_feeding/en/) (2019).
  166. Filteau, S. The HIV-exposed, uninfected African child. *Trop. Med. Int. Heal.* **14**, 276–287 (2009).
  167. Sperk, M., Domselaar, R. van & Neogi, U. Immune checkpoints as the immune system regulators and potential biomarkers in HIV-1 infection. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 2000 (2018).
  168. Wada, N. I. *et al.* Inflammatory biomarkers and mortality risk among HIV-suppressed men: a multisite prospective cohort study. *Clin. Infect. Dis.* **63**, 984–990 (2016).
  169. Patil, N. K., Guo, Y., Luan, L. & Sherwood, E. R. Targeting immune cell checkpoints during sepsis. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 2413 (2017).
  170. Topalian, S. L., Drake, C. G. & Pardoll, D. M. Immune checkpoint blockade: A common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell* **27**, 450–461 (2015).
  171. Klatt, N. R., Chomont, N., Douek, D. C. & Deeks, S. G. Immune activation and HIV persistence: implications for curative approaches to HIV infection. *Immunol. Rev.* **254**, 326–342 (2013).
  172. Prendergast, A. J. *et al.* Intestinal damage and inflammatory biomarkers in Human Immunodeficiency Virus (HIV)-exposed and HIV-infected zimbabwean infants. *J. Infect. Dis.* **216**, 651–661 (2017).
  173. Krebs, S. J. & Ananworanich, J. Immune activation during acute HIV infection and the impact of early antiretroviral therapy. *Curr. Opin. HIV AIDS* **11**, 163–172 (2016).
  174. Letizia, A. *et al.* Biomarkers of inflammation correlate with clinical scoring indices in Human Immunodeficiency Virus-infected kenyans. *J. Infect. Dis.* **219**, 284–294 (2019).
  175. UN Inter-agency Group for Child Mortality Estimation. CME Info - Child Mortality Estimates. <https://childmortality.org/data/Democratic Republic of the Congo> (2020).
  176. World Health Organization (WHO) & United Nations International Children's Emergency Fund (UNICEF). *Levels and trends in child mortality*. <https://www.unicef.org/reports/levels-and-trends-child-mortality-report-2020> (2020).
  177. World Health Organization (WHO) & United Nations International Children's Emergency Fund (UNICEF). *Levels and trends in child mortality*. <https://www.unicef.org/reports/levels-and-trends-child-mortality-report-2019> (2019).
  178. Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME). University of Washington. Global Burden of Disease. <https://vizhub.healthdata.org/gbd-compare/#> (2020).
  179. World Health Organization (WHO) & United Nations International Children's Emergency Fund (UNICEF). *Progress and Challenges with Achieving Universal Immunization Coverage 2019 WHO/UNICEF Estimates of National Immunization Coverage*. [https://www.who.int/immunization/monitoring\\_surveillance/who-immuniz.pdf](https://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/who-immuniz.pdf) (2020).
  180. World Health Organization (WHO). Immunization Country Profile of Democratic Republic of Congo. [https://apps.who.int/immunization\\_monitoring/globalsummary/countries?countrycriteria%5Bcountry%5D%5B%5D=COD&commit=OK](https://apps.who.int/immunization_monitoring/globalsummary/countries?countrycriteria%5Bcountry%5D%5B%5D=COD&commit=OK) (2020).
  181. Ducomble, T. & Gignoux, E. Learning from a massive epidemic: measles in DRC. *Lancet Infect. Dis.* **20**, 542 (2020).
  182. DRC Government. Santé pout tous et par tous (SANRU). La vaccination en République démocratique du Congo. 2019 <https://www.sanru.cd/index.php/conseils-sante/item/177-la-vaccination-en-republique-democratique-du-congo>.
  183. Government, C. I. H. U. Preventing Vaccine-Preventable Diseases in Children and Adolescents with HIV Infection. Pediatric Opportunistic Infection. <https://clinicalinfo.hiv.gov/en/guidelines/pediatric-opportunistic-infection/preventing-vaccine->

- preventable-diseases-children-and?view=full (2019).
184. Asociación Española de Pediatría (AEP) & Comité Asesor de Vacunas (CAV). Vacunación en niños infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). <https://vacunasaep.org/documentos/manual/cap-15#5.15> (2018).
  185. Center for Disease Control and Prevention (CDC). National Center for Immunization. General recommendations on immunization: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *CDC Recomm. Reports* **60**, 1–64 (2011).
  186. Moss, W. J., Clements, C. J. & Halsey, N. A. Immunization of children at risk of infection with human immunodeficiency virus. *Bull. World Health Organ.* **81**, 61–70 (2003).
  187. Tejiokem, M. C. *et al.* HIV-infected children living in Central Africa have low persistence of antibodies to vaccines used in the expanded program on immunization. *PLoS One* **2**, e1260 (2007).
  188. Sutcliffe, C. G. & Moss, W. J. Do children infected with HIV receiving HAART need to be revaccinated? *Lancet Infect. Dis.* **10**, 630–642 (2010).
  189. Agosti, J. M. Pediatric vaccines in HIV-infected children. *Curr. Opin. HIV AIDS* **2**, 385–390 (2007).
  190. Centre Hospitalier Monkole. <http://monkole.cd/>.
  191. Hôpital Pédiatrique Kalembe Lembe. <https://www.msv.be/hospital/hôpital-pédiatrique-kalembe-lembe-kinshasa#>.
  192. World Health Organization (WHO). *WHO Prequalification of In Vitro Diagnostics: Xpert® HIV-1 Qual Assay*. [https://www.who.int/diagnostics\\_laboratory/evaluations/pq-list/hiv-vrl/160613PQPublicReport\\_0259-0700-00\\_XpertQualHIV\\_v2.pdf](https://www.who.int/diagnostics_laboratory/evaluations/pq-list/hiv-vrl/160613PQPublicReport_0259-0700-00_XpertQualHIV_v2.pdf) (2016).
  193. Cepheid. Xpert HIV-1 Qual. <https://www.cepheid.com/en/tests/Virology/Xpert-HIV-1-Qual> (2020).
  194. Cepheid. Xpert HIV-1 Viral Load. <https://www.cepheid.com/en/tests/Virology/Xpert-HIV-1-Viral-Load> (2020).
  195. World Health Organization (WHO). *Prequalification of Diagnostics Programme. COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, version 2.0 (TaqMan 96)*. [https://www.who.int/diagnostics\\_laboratory/evaluations/pq-list/hiv-vrl/160530\\_0147\\_046\\_00\\_public\\_report\\_v1\\_final.pdf](https://www.who.int/diagnostics_laboratory/evaluations/pq-list/hiv-vrl/160530_0147_046_00_public_report_v1_final.pdf) (2012).
  196. Robins, E. B. & Blum, S. Hematologic reference values for African American children and adolescents. *Am. J. Hematol.* **82**, 611–614 (2007).
  197. American College of Physicians. *Normal laboratory values*. <https://annualmeeting.acponline.org/sites/default/files/shared/documents/for-meeting-attendees/normal-lab-values.pdf> (2014).
  198. France Recherche Nord & Sud SIDA-HIV Hépatites (ANRS) & National Agency for AIDS Research (ANRS). *ANRS AC11 Resistance Study Group PCR and Sequencing Procedures: HIV-1*. <http://www.hivfrenchresistance.org/ANRS-procedures.pdf> (2015).
  199. Stamatakis, A. RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* **30**, 1312–1313 (2014).
  200. Price, M. N., Dehal, P. S. & Arkin, A. P. FastTree 2 - Approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One* **5**, e9490 (2010).
  201. Martin, D. P. *et al.* RDP3: A flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics* **26**, 2462–2463 (2010).
  202. Tamura, K. & Masatoshi, N. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* **10**, 512–526 (1993).
  203. Kosakovsky Pond, S. L., Weaver, S., Leigh Brown, A. J. & Wertheim, J. O. HIV-TRACE (TRANsmiSSion Cluster Engine): a tool for large scale molecular epidemiology of HIV-1 and other rapidly evolving pathogens. *Mol. Biol. Evol.* **35**, 1812–1819 (2018).
  204. Wertheim, J. O. *et al.* Social and Genetic Networks of HIV-1 Transmission in New York City. *PLoS*

- Pathog.* **13**, e1006000 (2017).
205. Avendaño-Ortiz, J. *et al.* PD-L1 overexpression during endotoxin tolerance impairs the adaptive immune response in septic patients via HIF1 $\alpha$ . *J. Infect. Dis.* **217**, 393–404 (2018).
  206. Flajnik, M. F., Tlapakova, T., Criscitiello, M. F., Krylov, V. & Ohta, Y. Evolution of the B7 family: Co-evolution of B7H6 and NKp30, identification of a new B7 family member, B7H7, and of B7's historical relationship with the MHC. *Immunogenetics* **64**, 571–590 (2012).
  207. Wykes, M. N. & Lewin, S. R. Immune checkpoint blockade in infectious diseases. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 91–104 (2018).
  208. Von Gunten, S. & Bochner, B. S. Basic and clinical immunology of Siglecs. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1143**, 61–82 (2008).
  209. Knudsen, T. B. *et al.* Plasma CD163 independently predicts all-cause mortality from HIV-1 infection. *J. Infect. Dis.* **214**, 1198–1204 (2016).
  210. Avendaño-Ortiz, J. *et al.* PD-L1 Overexpression During Endotoxin Tolerance Impairs the Adaptive Immune Response in Septic Patients via HIF1 $\alpha$ . *J. Infect. Dis.* **217**, 393–404 (2018).
  211. Wykes, M. N. & Lewin, S. R. Immune checkpoint blockade in infectious diseases. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 91–104 (2018).
  212. Martin Bland, J. & Altman, D. G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* **327**, 307–310 (1986).
  213. Saag, M. S. *et al.* HIV viral load markers in clinical practice. *Nat. Med.* **2**, 625–629 (1996).
  214. Clinical Info HIV. USA Government. *Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Adults and Adolescents with HIV*. <https://clinicalinfo.hiv.gov/en/guidelines/adult-and-adolescent-arv/what-start-initial-combination-regimens-antiretroviral-naive?view=full> (2019).
  215. Sollis, K. A. *et al.* Systematic review of the performance of HIV viral load technologies on plasma samples. *PLoS One* **9**, 85869 (2014).
  216. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). *UNAIDS DATA 2017*. [https://www.unaids.org/sites/default/files/media\\_asset/20170720\\_Data\\_book\\_2017\\_en.pdf](https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/20170720_Data_book_2017_en.pdf) (2017).
  217. Rutstein, S. E. *et al.* On the front line of HIV virological monitoring: Barriers and facilitators from a provider perspective in resource-limited settings. *AIDS Care - Psychol. Socio-Medical Asp. AIDS/HIV* **28**, 1–10 (2016).
  218. Bélec, L. & Bonn, J. P. Challenges in implementing HIV laboratory monitoring in resource-constrained settings: how to do more with less. *Future Microbiol.* **6**, 1251–1260 (2011).
  219. Kageha, S. *et al.* Discrepant test findings in early infant diagnosis of HIV in a national reference laboratory in Kenya: challenges and opportunities for Programs. *J. Trop. Pediatr.* **58**, 247–252 (2012).
  220. Maritz, J., van Zyl, G. U. & Preiser, W. Irreproducible positive results on the Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 Qual test are different qualitatively from confirmed positive results. *J. Med. Virol.* **86**, 82–87 (2014).
  221. Sutcliffe, C. G., Moss, W. J. & Thuma, P. E. False-positive HIV test results in infancy and management of uninfected children receiving antiretroviral therapy. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **34**, 607–609 (2015).
  222. Avettand-Fénoël, V. *et al.* Comparative performance of the Biocentric Generic Viral Load, Roche CAP/CTM v1.5, Roche CAP/CTM v2.0 and m2000 Abbott assays for quantifying HIV-1 B and non-B strains: Underestimation of some CRF02 strains. *J. Clin. Virol.* **110**, 36–41 (2019).
  223. Worobey, M. *et al.* Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960. *Nature* **455**, 661–664 (2008).
  224. Potts, K. E. *et al.* Genetic diversity of Human Immunodeficiency Virus type 1 strains in Kinshasa, Zaire. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **9**, 613–618 (1993).



225. Vidal, N., Mulanga-Kabeya, C., Nzilambi, N., Delaporte, E. & Peeters, M. Identification of a complex env subtype E HIV type 1 virus from the Democratic Republic of Congo, recombinant with A, G, H, J, K, and unknown subtypes. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **16**, 2059–2064 (2000).
226. Vidal, N. *et al.* Unprecedented degree of Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) group M genetic diversity in the Democratic Republic of Congo suggests that the HIV-1 pandemic originated in Central Africa. *J. Virol.* **74**, 10498–10507 (2000).
227. Vidal, N. *et al.* Characterization of an old complex circulating recombinant form, CRF27\_cpx, originating from the Democratic Republic of Congo (DRC) and circulating in France. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **24**, 315–321 (2008).
228. Djoko, C. F. *et al.* High HIV type 1 group M pol diversity and low rate of antiretroviral resistance mutations among the uniformed services in Kinshasa, Democratic Republic of the Congo. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **27**, 323–329 (2011).
229. Yang, C. *et al.* Genetic diversification and recombination of HIV type 1 group M in Kinshasa, Democratic Republic of Congo. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **21**, 661–666 (2005).
230. Ward, M. J., Lycett, S. J., Kalish, M. L., Rambaut, A. & Leigh Brown, A. J. Estimating the Rate of Intersubtype Recombination in Early HIV-1 Group M Strains. *J. Virol.* **87**, 1967–1973 (2013).
231. Food and Drug Administration (FDA). *Determine™ HIV-1/2 Ag/Ab Combo (Alere)*. <https://www.fda.gov/media/86959/download> (2013).
232. World Health Organization (WHO). *Uni-Gold™ HIV*. [https://www.who.int/diagnostics\\_laboratory/evaluations/pq-list/hiv-rdts/170726\\_amended\\_final\\_pqpr\\_0149\\_052\\_00\\_v5.pdf](https://www.who.int/diagnostics_laboratory/evaluations/pq-list/hiv-rdts/170726_amended_final_pqpr_0149_052_00_v5.pdf) (2017).
233. Organics. *Double Check™ HIV 1&2 (Organics)*. <http://www.biosystemsantioquia.com.co/images/nuestras-marcas/doble-check-gold/DOUBLE-CHECK-GOLD-HIV .pdf> (2006).
234. Food and Drug Administration (FDA). *Elecsys HIV combi PT (Roche)*. (2018).
235. Biomerieux. VIDAS® HIV Duo Quick. [www.biomerieux.com/techlib](http://www.biomerieux.com/techlib) (2015).
236. Bio-Rad. *Geenius™ HIV 1/2 Confirmatory Assay*. [https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/en/883601\\_EN.pdf](https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/en/883601_EN.pdf) (2013).
237. U.S. Food and Drug Administration (FDA). *COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test*. <https://www.fda.gov/media/73824/download> (2007).
238. Mallampati, D., Ford, N., Hanaford, A., Sugandhi, N. & Penazzato, M. Performance of virological testing for early infant diagnosis: a systematic review. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **75**, 308–314 (2017).
239. Cohen, M. S. *et al.* Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy. *N. Engl. J. Med.* **365**, 493–505 (2011).
240. Bhattacharya, R., Barton, S. & Catalan, J. When good news is bad news: Psychological impact of false positive diagnosis of HIV. *AIDS Care - Psychol. Socio-Medical Asp. AIDS/HIV* **20**, 560–564 (2008).
241. Schmitz, M. E. *et al.* Field evaluation of dried blood spots for HIV-1 viral load monitoring in adults and children receiving antiretroviral treatment in Kenya: Implications for scale-up in resource-limited settings. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **74**, 399–406 (2017).
242. Dunning, L. *et al.* The value of confirmatory testing in early infant HIV diagnosis programmes in South Africa: A cost-effectiveness analysis. *PLoS Med.* **14**, 1002446 (2017).
243. Tan, W. S. *et al.* Sensitivity of HIV rapid tests compared with fourth-generation enzyme immunoassays or HIV RNA tests. *AIDS* **30**, 1951–1960 (2016).
244. Rakovsky, A. *et al.* Diagnosis of HIV-1 infection: Performance of Xpert Qual and Geenius supplemental assays in fourth generation ELISA-reactive samples. *J. Clin. Virol.* **101**, 7–10 (2018).
245. Sanders, E. J. *et al.* Targeted screening of at-risk adults for acute HIV-1 infection in sub-Saharan Africa. *AIDS* **29**, S221–S230 (2015).

246. Ceffa, S. *et al.* Comparison of the Cepheid GeneXpert and Abbott M2000 HIV-1 real time molecular assays for monitoring HIV-1 viral load and detecting HIV-1 infection. *J. Virol. Methods* **229**, 35–39 (2016).
247. Guichet, E. *et al.* Short communication: high viral load and multidrug resistance due to late switch to second-line regimens could be a major obstacle to reach the 90-90-90 UNAIDS objectives in Sub-Saharan Africa. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **32**, 1159–1162 (2016).
248. De Oliveira, F. *et al.* Detection of numerous HIV-1/MO recombinants in France. *AIDS* **32**, 1289–1299 (2018).
249. Avidor, B. *et al.* Comparison between Roche and Xpert in HIV-1 RNA quantitation: A high concordance between the two techniques except for a CRF02\_AG subtype variant with high viral load titers detected by Roche but undetected by Xpert. *J. Clin. Virol.* **93**, 15–19 (2017).
250. Mor, O. *et al.* Evaluation of the real time HIV-1, xpert HIV-1, and aptima HIV-1 quant dx assays in comparison to the nucli sens EasyQ HIV-1 v2.0 assay for quantification of HIV-1 viral load. *J. Clin. Microbiol.* **53**, 3458–3465 (2015).
251. Muenchhoff, M. *et al.* Evaluation of the NucliSens EasyQ v2.0 assay in comparison with the Roche Amplicor v1.5 and the Roche CAP/CTM HIV-1 test v2.0 in quantification of C-Clade HIV-1 in plasma. *PLoS One* **9**, e103983 (2014).
252. Bruzzzone, B. *et al.* Xpert HIV-1 viral load assay and versant HIV-1 RNA 1.5 assay: A performance comparison. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **74**, e86–e88 (2017).
253. Jordan, J. A., Plantier, J. C., Templeton, K. & Wu, A. H. B. Multi-site clinical evaluation of the Xpert® HIV-1 viral load assay. *J. Clin. Virol.* **80**, 27–32 (2016).
254. Gueudin, M. *et al.* Performance evaluation of the new HIV-1 quantification assay, Xpert HIV-1 Viral Load, on a wide panel of HIV-1 variants. *JAIDS J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **72**, 521–526 (2016).
255. Ibrahim, M. *et al.* Brief report: high sensitivity and specificity of the Cepheid Xpert HIV-1 Qualitative Point-of-Care test among newborns in Botswana. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **75**, e128–e131 (2017).
256. Gous, N., Scott, L., Berrie, L. & Stevens, W. Options to expand HIV viral load testing in South Africa: Evaluation of the genexpert® HIV-1 viral load assay. *PLoS One* **11**, e0168244 (2016).
257. Moyo, S. *et al.* Point-of-care Cepheid Xpert HIV-1 viral load test in rural African communities is feasible and reliable. *J. Clin. Microbiol.* **54**, 3050–3055 (2016).
258. Garrett, N. J., Drain, P. K., Werner, L., Samsunder, N. & Abdool Karim, S. S. Diagnostic accuracy of the point-of-care xpert HIV-1 viral load assay in a south african HIV clinic. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **72**, e45–e48 (2016).
259. Mbonze, N. B. *et al.* Xpert® MTB/RIF for smear-negative presumptive TB: Impact on case notification in DR Congo. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **20**, 240–246 (2016).
260. Haddar, C., Begaud, E., Maslin, J. & Germani, Y. Tests de diagnostic rapide des shigelloses. *Bull. la Soc. Pathol. Exot.* **110**, 1–8 (2017).
261. Li, D. *et al.* Evaluation of the GeneXpert for human monkeypox diagnosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **96**, 405–410 (2017).
262. Makadzange, A. T. *et al.* A simple phosphate-buffered-saline-based extraction method improves specificity of HIV viral load monitoring using dried blood spots. *J. Clin. Microbiol.* **55**, 2172–2179 (2017).
263. Amornkul, P. N. *et al.* Disease progression by infecting HIV-1 subtype in a seroconverter cohort in sub-Saharan Africa. *AIDS* **27**, 2775–2786 (2013).
264. Venner, C. M. *et al.* Infecting HIV-1 subtype predicts disease progression in women of Sub-Saharan Africa. *EBioMedicine* **13**, 305–314 (2016).
265. Price, M. A. *et al.* Control of the HIV-1 load varies by viral subtype in a large cohort of african adults with incident HIV-1 infection. *J. Infect. Dis.* **220**, 432–441 (2019).
266. Bhargava, M., Cajas, J. M., Wainberg, M. A., Klein, M. B. & Pai, N. P. Do HIV-1 non-B subtypes

- differentially impact resistance mutations and clinical disease progression in treated populations? Evidence from a systematic review. *J. Int. AIDS Soc.* **17**, 18944 (2014).
267. Tebit, D. M. & Arts, E. J. Tracking a century of global expansion and evolution of HIV to drive understanding and to combat disease. *Lancet Infect. Dis.* **11**, 45–56 (2011).
  268. Junqueira, D. M. & de Matos Almeida, S. E. HIV-1 subtype B: Traces of a pandemic. *Virology* **495**, 173–184 (2016).
  269. Taylor, B. S., Sobieszczyk, M. E., McCutchan, F. E. & Hammer, S. M. The challenge of HIV-1 subtype diversity. *N. Engl. J. Med.* **358**, 1590 (2008).
  270. Zhu, T. *et al.* An african HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature* **391**, 594–597 (1998).
  271. Gryseels, S. *et al.* A near-full-length HIV-1 genome from 1966 recovered from formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, 12222–12229 (2020).
  272. Faria, N. R. *et al.* Distinct rates and patterns of spread of the major HIV-1 subtypes in Central and East Africa. *PLoS Pathog.* **15**, e1007976 (2019).
  273. Rodgers, M. A. *et al.* Sensitive next-generation sequencing method reveals deep genetic diversity of HIV-1 in the Democratic Republic of the Congo. *J. Virol.* **91**, e01841-16 (2017).
  274. Kamangu, E. N. Implication of neighbors in the genetic diversity of the Human Immunodeficiency Virus type 1 in the Democratic Republic of Congo. *ARC J. AIDS* **3**, 26–28 (2018).
  275. Peeters, M., Mulanga-Kabeya, C. & Delaporte, E. The genetic diversity of HIV1. *Virologie* **4**, 371–381 (2020).
  276. Carr, J. K. Viral diversity as a challenge to HIV-1 vaccine development. *Curr. Opin. HIV AIDS* **1**, 294–300 (2006).
  277. Gaschen, B. *et al.* Diversity considerations in HIV-1 vaccine selection. *Science* **296**, 2354–2360 (2002).
  278. Mokili, J. L. K. *et al.* Genetic heterogeneity of HIV type 1 subtypes in Kimpese, rural democratic republic of congo. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **15**, 655–664 (1999).
  279. Mokili, J. L. K. *et al.* Identification of a novel clade of human immunodeficiency virus type 1 in Democratic Republic of Congo. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **18**, 817–823 (2002).
  280. Triques, K. *et al.* Near-full-length genome sequencing of divergent African HIV type 1 subtype F viruses leads to the identification of a new HIV type 1 subtype designated K. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **16**, 139–151 (2000).
  281. Yang, C. *et al.* Predominance of HIV type 1 subtype G among commercial sex workers from Kinshasa, Democratic Republic of Congo. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **17**, 361–365 (2001).
  282. Gao F, Trask SA, Hui H, Mamaeva O, Chen Y, Theodore TS, Foley BT, Korber BT, Shaw GM, H. B. Molecular characterization of a highly divergent HIV type 1 isolate obtained early in the AIDS epidemic from the Democratic Republic of Congo. *AIDS Res Hum Retroviruses* **17**, 1217–1222 (2001).
  283. Kita, K. *et al.* Genetic diversity of HIV type 1 in Likasi, southeast of the Democratic Republic of Congo. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **20**, 1352–1357 (2004).
  284. Vidal, N. *et al.* Distribution of HIV-1 variants in the Democratic Republic of Congo suggests increase of subtype C in Kinshasa between 1997 and 2002. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **40**, 456–462 (2005).
  285. Vidal, N. *et al.* Identification and molecular characterization of subsubtype A4 in Central Africa. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **22**, 182–187 (2006).
  286. Vidal, N. *et al.* HIV type 1 pol gene diversity and antiretroviral drug resistance mutations in the Democratic Republic of Congo (DRC). *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **22**, 202–206 (2006).
  287. Vidal, N., Bazepeo, S. E., Mulanga, C., Delaporte, E. & Peeters, M. Genetic characterization of eight full-length HIV type 1 genomes from the democratic republic of Congo (DRC) reveal a new



- subsubtype, A5, in the a radiation that predominates in the recombinant structure of CRF26-A5U. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **25**, 823–832 (2009).
288. Niama, F. R. *et al.* CRF45-AKU, a circulating recombinant from central Africa, is probably the common ancestor of HIV Type 1 MAL and HIV type 1 NOGIL. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **25**, 1345–1353 (2009).
  289. Huang, D. D., Foley, B. T., Tolzmann, C. A., Ouma, A. & Bremer, J. W. Complex mosaic composition of near full-length genomes of two NED (NIH-ENVA-DOD) subtype panel HIV type 1 strains, BCF-Dioum and BCF-Kita, originating from the Democratic Republic of Congo (DRC). *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **25**, 1039–1043 (2009).
  290. Muwonga, J. *et al.* Resistance to antiretroviral drugs in treated and drug-naïve patients in the democratic Republic of Congo. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **57**, 27–33 (2011).
  291. Kamangu, E. N. *et al.* Genetic diversity and antiretroviral drug resistance among drug-naïve HIV type 1 infected patients attending clinics in Kinshasa, Democratic Republic of Congo. *J. HIV AIDS* 1–6 (2015).
  292. Boillot, F. *et al.* Implementation and operational research: programmatic feasibility of dried blood spots for the virological follow-up of patients on antiretroviral treatment in Nord Kivu, Democratic Republic of the Congo. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **71**, e9–e15 (2016).
  293. Villabona Arenas, C. *et al.* Divergent HIV-1 strains (CRF92\_C2U and CRF93\_cpx) co-circulating in the Democratic Republic of the Congo: Phylogenetic insights on the early evolutionary history of subtype C. *Virus Evol.* **3**, vex032–vex032 (2017).
  294. Kamangu, E., Kabututu, Z., Mvumbi, L. G., Kalala L.R. & Mesia, K. G. Genetic diversity of human immunodeficiency virus type 1 in the Democratic Republic of Congo: a review of available data. *Int. J. Collab. Res. Intern. Med. Public Heal.* **5**, 295–309 (2013).
  295. Olabode, A. S. *et al.* Evidence for a recombinant origin of HIV-1 Group M from genomic variation. *Virus Evol.* **5**, vey039 (2019).
  296. Fernández-García, A. *et al.* Identification of a new HIV type 1 circulating BF intersubtype recombinant form (CRF47-BF) in Spain. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **26**, 827–832 (2010).
  297. Kamangu, E., Ikolango, B. B. & Ilunga, B. B. Evolution of subtypes of the Human Immunodeficiency Virus type 1 in Kinshasa over the last 30 years: documentary review from 1985 to 2015. *Mathews J. HIV/AIDS* **2**, 014 (2017).
  298. Gartner, M. J., Roche, M., Churchill, M. J., Gorry, P. R. & Flynn, J. K. Understanding the mechanisms driving the spread of subtype C HIV-1. *EBioMedicine* **53**, 102682 (2020).
  299. Hassan, A. S., Pybus, O. G., Sanders, E. J., Albert, J. & Esbjörnsson, J. Defining HIV-1 transmission clusters based on sequence data. *AIDS* **31**, 1211–1222 (2017).
  300. Van De Vijver, D. A. M. C. & Boucher, C. A. B. Insights on transmission of HIV from phylogenetic analysis to locally optimize HIV prevention strategies. *Curr. Opin. HIV AIDS* **13**, 95–101 (2018).
  301. Wertheim, J. O. *et al.* The global transmission network of HIV-1. *J. Infect. Dis.* **209**, 304–313 (2014).
  302. Stone, M. *et al.* Comparison of detection limits of fourth- and fifth-generation combination HIV antigen-antibody, p24 antigen, and viral load assays on diverse HIV isolates. *J. Clin. Microbiol.* **56**, e02045-17 (2018).
  303. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). *How AIDS changed everything*. [https://www.unaids.org/sites/default/files/media\\_asset/MDG6Report\\_en.pdf](https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/MDG6Report_en.pdf) (2015).
  304. World Health Organization (WHO). *Global Report on Early Warning Indicators of HIV Drug Resistance Technical Report*. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/246219/9789241511179-eng.pdf> (2016).
  305. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). *Understanding Fast-Track Targets. Accelerating action to end the AIDS epidemic by 2030*. [https://www.unaids.org/sites/default/files/media\\_asset/201506\\_JC2743\\_Understanding\\_FastTrack\\_en.pdf](https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/201506_JC2743_Understanding_FastTrack_en.pdf) (2015).

306. D'Aquila, R. T. *et al.* Zidovudine resistance and HIV-1 disease progression during antiretroviral therapy. AIDS Clinical Trials Group Protocol 116B/117 Team and the Virology Committee Resistance Working Group. *Ann. Intern. Med.* **122**, 401–408 (1995).
307. Havlir, D. V. *et al.* Maintenance antiretroviral therapies in HIV-infected subjects with undetectable plasma HIV RNA after triple-drug therapy. *N. Engl. J. Med.* **339**, 1261–1268 (1998).
308. Miller, V. *et al.* Dual resistance to zidovudine and lamivudine in patients treated with zidovudine-lamivudine combination therapy: association with therapy failure. *J. Infect. Dis.* **177**, 1521–1532 (1998).
309. Rey, D. *et al.* HIV-1 reverse transcriptase codon 215 mutation in plasma RNA: immunologic and virologic responses to zidovudine. The AIDS Clinical Trials Group Study 175 Virology Team. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirology* **17**, 203–208 (1998).
310. Granich, R. M., Gilks, C. F., Dye, C., De Cock, K. M. & Williams, B. G. Universal voluntary HIV testing with immediate antiretroviral therapy as a strategy for elimination of HIV transmission: a mathematical model. *Lancet* **373**, 48–57 (2009).
311. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). Issues New Fast-Track Strategy to end AIDS by 2030 - EGPAF. <https://www.pedaids.org/2014/11/20/unaid-issues-new-fast-track-strategy-to-end-aids-by-2030/> (2014).
312. United Nations International Children's Emergency Fund (UNICEF). HIV and AIDS in Adolescents. <https://data.unicef.org/topic/adolescents/hiv-aids/> (2019).
313. World Health Organization (WHO). *HIV and Adolescents: Guidance for HIV Testing and Counselling and Care for Adolescents Living with HIV*. <https://www.who.int/hiv/pub/guidelines/adolescents/en/> (2013).
314. Gils, T. *et al.* Stockouts of HIV commodities in public health facilities in Kinshasa: Barriers to end HIV. *PLoS One* **13**, e0191294 (2018).
315. de Waal, R. *et al.* HIV drug resistance in Sub-Saharan Africa: public health questions and the potential role of real-world data and mathematical modelling. *J. Virus Erad* **4**, 55–58 (2018).
316. Oliveira, M. *et al.* The M184I/V and K65R nucleoside resistance mutations in HIV-1 prevent the emergence of resistance mutations against dolutegravir. *AIDS* **30**, 2267–2273 (2016).
317. Stadeli, K. M. & Richman, D. D. Rates of emergence of HIV drug resistance in resource-limited settings: A systematic review. *Antivir. Ther.* **18**, 115–123 (2013).
318. Jalbert, E. *et al.* HIV-exposed uninfected infants have increased regulatory T cells that correlate with decreased T cell function. *Front. Immunol.* **10**, 595 (2019).
319. Sandler, N. G. *et al.* Plasma levels of soluble CD14 independently predict mortality in HIV infection. *J. Infect. Dis.* **203**, 780–790 (2011).
320. Krishnan, S. *et al.* Evidence for innate immune system activation in HIV type 1-infected elite controllers. *J. Infect. Dis.* **209**, 931–939 (2014).
321. Wada, N. I. *et al.* The effect of HAART-induced HIV suppression on circulating markers of inflammation and immune activation. *AIDS* **29**, 463–471 (2015).
322. Kirkegaard-Klitbo, D. M. *et al.* Soluble CD163 predicts incident chronic lung, kidney and liver disease in HIV infection. *AIDS* **31**, 981–988 (2017).
323. Weersma, R. K. *et al.* Association of interleukin-1 receptor-associated kinase M (IRAK-M) and inflammatory bowel diseases. *Scand. J. Gastroenterol.* **42**, 827–833 (2007).
324. Hu, K. *et al.* Interaction between herpesvirus entry mediator and HSV-2 glycoproteins mediates HIV-1 entry of HSV-2-infected epithelial cells. *J. Gen. Virol.* **98**, 2351–2361 (2017).
325. Deshmane, S. L., Amini, S., Sen, S., Khalili, K. & Sawaya, B. E. Regulation of the HIV-1 promoter by HIF-1 and Vpr proteins. *Viol. J.* **8**, 477 (2011).
326. Li, Y., Zhao, L., Qi, Y. & Yang, X. MicroRNA-214 upregulates HIF-1 $\alpha$  and VEGF by targeting ING4 in lung cancer cells. *Mol. Med. Rep.* **19**, 4935–4945 (2019).

327. Chaudhry, A. *et al.* HIV-1 Nef induces a Rab11-dependent routing of endocytosed immune costimulatory proteins CD80 and CD86 to the Golgi. *Traffic* **9**, 1925–1935 (2008).
328. Munday, J. *et al.* Identification, characterization and leucocyte expression of Siglec-10, a novel human sialic acid-binding receptor. *Biochem. J.* **355**, 489–497 (2001).
329. Dong, Z., Zhang, L., Xu, W. & Zhang, G. EGFR may participate in immune evasion through regulation of B7-H5 expression in non-small cell lung carcinoma. *Mol. Med. Rep.* **18**, 3769–3779 (2018).
330. Hileman, C. O. & Funderburg, N. T. Inflammation, immune activation, and antiretroviral therapy in HIV. *Curr. HIV/AIDS Rep.* **14**, 93–100 (2017).
331. Baroncelli, S. *et al.* Immune activation and microbial translocation markers in HIV-exposed uninfected malawian infants in the first year of life. *J. Trop. Pediatr.* **65**, 617–625 (2019).
332. World Health Organization (WHO). Immunization coverage. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/immunization-coverage> (2020).
333. Lassi, Z. S. *et al.* Essential interventions for child health. *Reprod. Health* **11**, S4 (2014).
334. Acharya, P., Kismul, H., Mapatano, M. A. & Hatløy, A. Individual- and community-level determinants of child immunization in the democratic republic of congo: A multilevel analysis. *PLoS One* **13**, e0202742 (2018).
335. World Health Organization (WHO). Immunization. <https://www.who.int/gho/immunization/en/> (2020).
336. Center for Disease Control and Prevention (CDC) Global Health. Fostering Ownership of Childhood Immunization Data in Democratic Republic of Congo. <https://www.cdc.gov/globalhealth/immunization/stories/child-immunization-drc.htm> (2014).
337. Adetokunboh, O. O., Ndwandwe, D., Awotiwon, A., Uthman, O. A. & Wiysonge, C. S. Vaccination among HIV-infected, HIV-exposed uninfected and HIV-uninfected children: a systematic review and meta-analysis of evidence related to vaccine efficacy and effectiveness. *Hum. Vaccines Immunother.* **15**, 2578–2589 (2019).
338. Cutts, F. T. & Hanson, M. Seroepidemiology: an underused tool for designing and monitoring vaccination programmes in low- and middle-income countries. *Trop. Med. Int. Heal.* **21**, 1086–1098 (2016).
339. Guerra, F. M. *et al.* The basic reproduction number (R0) of measles: a systematic review. *Lancet Infect. Dis.* **17**, e420–e428 (2017).
340. Edmunds, W. J., Gay, N. J., Kretzschmar, M., Pebody, R. G. & Wachmann, H. The pre-vaccination epidemiology of measles, mumps and rubella in Europe: Implications for modelling studies. *Epidemiol. Infect.* **125**, 635–650 (2000).
341. World Health Organization (WHO). Measles vaccines: WHO position paper. *Wkly. Epidemiol. Rec.* **17**, 205–228 (2017).
342. Davidkin, I., Jokinen, S., Broman, M., Leinikki, P. & Peltola, H. Persistence of measles, mumps, and rubella antibodies in an MMR-vaccinated cohort: a 20-year follow-up. *J. Infect. Dis.* **197**, 950–956 (2008).
343. Weibel, R. E., Buynak, E. B., McLean, A. A., Roehm, R. R. & Hilleman, M. R. Persistence of antibody in human subjects for 7 to 10 years following administration of combined live attenuated measles, mumps, and rubella virus vaccines. *Exp. Biol. Med.* **165**, 260–263 (1980).
344. Ashbaugh, H. R. *et al.* Measles antibody levels among vaccinated and unvaccinated children 6–59 months of age in the Democratic Republic of the Congo, 2013–2014. *Vaccine* **38**, 2258–2265 (2020).
345. World Health Organization (WHO). WHO vaccine-preventable diseases: monitoring system. [https://apps.who.int/immunization\\_monitoring/globalsummary/estimates?c=COD](https://apps.who.int/immunization_monitoring/globalsummary/estimates?c=COD) (2020).
346. Tuaillon, E. *et al.* Dried blood spot for hepatitis C virus serology and molecular testing. *Hepatology* **51**, 752–758 (2009).

347. Tejada-Strop, A. *et al.* Disparate detection outcomes for anti-HCV IgG and HCV RNA in dried blood spots. *J. Virol. Methods* **212**, 66–70 (2015).
348. Higgins, S. G. *et al.* Field test and validation of the multiplier measles, mumps, rubella, and varicella-zoster multiplexed assay system in the Democratic Republic of the Congo by using dried blood spots. *mSphere* **4**, e00112-19 (2019).
349. Colson, K. E. *et al.* Use of a commercial ELISA for the detection of measles-specific immunoglobulin G (IgG) in dried blood spots collected from children living in low-resource settings. *J. Med. Virol.* **87**, 1491–1499 (2015).
350. Mercader, S., Featherstone, D. & Bellini, W. J. Comparison of available methods to elute serum from dried blood spot samples for measles serology. *J. Virol. Methods* **137**, 140–149 (2006).
351. Krumova, S. *et al.* Dried blood spots as a clinical samples for laboratory diagnosis and surveillance of vaccine-preventable diseases in Bulgaria. *Technol. Sci. Am. Sci. Res. J. Eng.* **51**, 183–191 (2019).
352. Karapanagiotidis, T., Riddell, M. & Kelly, H. Detection of rubella immunoglobulin M from dried venous blood spots using a commercial enzyme immunoassay. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **53**, 107–111 (2005).
353. Holguín, A. *et al.* Dried blood as an alternative to plasma or serum for *Trypanosoma cruzi* IgG detection in screening programs. *Clin. Vaccine Immunol.* **20**, 1197–1202 (2013).
354. Crimmins, E. *et al.* Validation of blood-based assays using dried blood spots for use in large population studies. *Biodemography Soc. Biol.* **60**, 38–48 (2014).
355. Center for Disease Control and Prevention (CDC). Complicaciones del sarampión. <https://www.cdc.gov/measles/symptoms/complications-sp.html>.
356. McGirr, A. & Fisman, D. N. Duration of pertussis immunity after DTaP immunization: A meta-analysis. *Pediatrics* **135**, 331–343 (2015).
357. Voysey, M. *et al.* The predicted persistence and kinetics of antibody decline 9 years after pre-school booster vaccination in UK children. *Vaccine* **34**, 4221–4228 (2016).
358. Haralambieva, I. H., Kennedy, R. B., Ovsyannikova, I. G., Whitaker, J. A. & Poland, G. A. Variability in humoral immunity to measles vaccine: new developments. *Trends Mol. Med.* **21**, 789–801 (2015).
359. Niewiesk, S. Maternal antibodies: clinical significance, mechanism of interference with immune responses, and possible vaccination strategies. *Front. Immunol.* **5**, 446 (2014).
360. Holzmann, H., Hengel, H., Tenbusch, M. & Doerr, H. W. Eradication of measles: remaining challenges. *Med. Microbiol. Immunol.* **205**, 201–208 (2016).
361. WHITTLE, H. *et al.* Poor serologic responses five to seven years after immunization with high and standard titer measles vaccines. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **18**, 53–57 (1999).
362. World Health Organization (WHO). *The Immunological Basis for Immunization Series*. WHO [http://www.who.int/immunization/documents/immunological\\_basis\\_series/en/](http://www.who.int/immunization/documents/immunological_basis_series/en/) (2020).
363. Comité Asesor de Vacunas de la AEP. Vacunas de la A a la Z. <https://vacunasaep.org/documentos/manual/seccion-iv>.
364. Moss, W. J. *et al.* Immunogenicity of standard-titer measles vaccine in HIV-1-infected and uninfected zambian children: An observational study. *J. Infect. Dis.* **196**, 347–355 (2007).
365. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Legislación sobre Productos sanitarios para diagnóstico «in vitro». <https://www.aemps.gob.es/productos-sanitarios/prodsanitarios/legislacion-sobre-productos-sanitarios-para-diagnostico-in-vitro/#C1> (2019).

# Anexo I

# Material suplementario de Materiales y Métodos

**Figura Suplementaria I.1. Ficha clínica de los pacientes incorporados en el estudio desde los hospitales de Kinshasa.**

<b>CODIFICACIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE SECA (DBS)</b>			
Codificación en el hospital del paciente (lactante / niño):			
Codificación de la muestra de DBS (código de paciente aaaa-RDC):			
Fecha de toma de DBS (3 tarjetas/paciente; 5 gotas/tarjeta):			
Nombre del técnico que realiza la DBS:			

<b>DATOS EPIDEMIOLÓGICOS DE LOS NIÑOS</b>			
<b>Edad :</b> ____ años, ____ meses, ____ días.			
<b>Género:</b> Masculino: <input type="checkbox"/> Femenino: <input type="checkbox"/>			
<b>Huérfano:</b> Sí: <input type="checkbox"/> No: <input type="checkbox"/>			
<b>Lugar de nacimiento:</b>			
<b>País:</b>			

<b>DATOS CLÍNICOS DE LOS NIÑOS</b>			
<b>Estado del niño:</b> VIH+ <input type="checkbox"/> VIH- <input type="checkbox"/> Expuesto <input type="checkbox"/> Desconocido <input type="checkbox"/>			
<b>Vía de transmisión:</b> Vertical <input type="checkbox"/> Sexual <input type="checkbox"/> Transfusión <input type="checkbox"/> Desconocido <input type="checkbox"/>			
<b>Médico encargado del seguimiento del niño:</b>			
Fecha de la 1ª prueba serológica de diagnóstico si se realizó (día/mes/año) y técnica utilizada:			
Fecha de la prueba serológica confirmatoria si se realizó (día/mes/año) y técnica utilizada:			
Fecha del 1er diagnóstico molecular si se realizó (día/mes/año) y técnica utilizada:			
Estadio clínico según la clasificación de la OMS: 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/>			
Lactancia:      Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Desconocido <input type="checkbox"/>			
Ultimo valor de células T CD4 si está disponible y fecha:			
Carga viral previa si está disponible (fecha y técnica):			

Profilaxis antirretroviral después del nacimiento	Antirretrovirales utilizados	Fecha de inicio (día/mes/año)	Fecha de finalización (día/mes/año)

Régimen antirretroviral después de la confirmación de VIH positivo	Antirretrovirales utilizados	Fecha de inicio (día/mes/año)	Fecha de finalización (día/mes/año)
1°			
2°			
3°			

Fallos de tratamiento anteriores      Sí ☐      No ☐      Desconocido ☐

Si se conocen coinfecciones:

Otra información interesante:

**DATOS CLÍNICOS DE LA MADRE**Estado de la madre: VIH+ ☐ VIH- ☐ Desconocido ☐

Fecha de diagnóstico de la madre:

Técnica :

Vía de transmisión : Vertical ☐ Sexual ☐ Transfusión ☐ Otras ☐Terapia antirretroviral materna durante el embarazo: Sí ☐ No ☐ Desconocido ☐

Antirretrovirales utilizados y duración:

Adherencia al tratamiento si está disponible (declarado)

Terapia antirretroviral en la madre durante el parto: Sí ☐ No ☐ Desconocido ☐

Antirretrovirales utilizados y duración:

Adherencia al tratamiento si está disponible (declarado)

Lactancia del niño expuesto: Sí ☐ No ☐ Desconocido ☐

Duración de la lactancia materna (en meses desde el nacimiento):

Terapia antirretroviral durante la lactancia: Sí ☐ No ☐

Adherencia al tratamiento si está disponible (declarado):

Carga viral de la madre próxima al parto si se hace:

RNA-HIV-1 copias/ml:

Técnica

Fecha

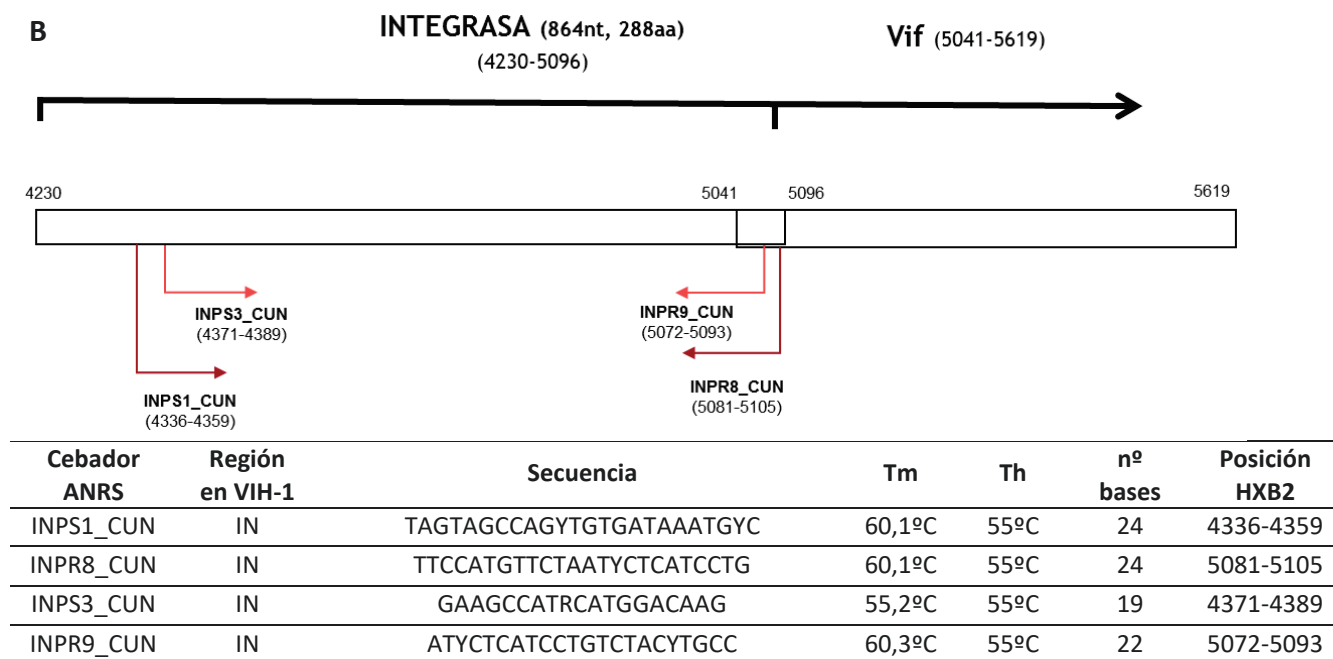
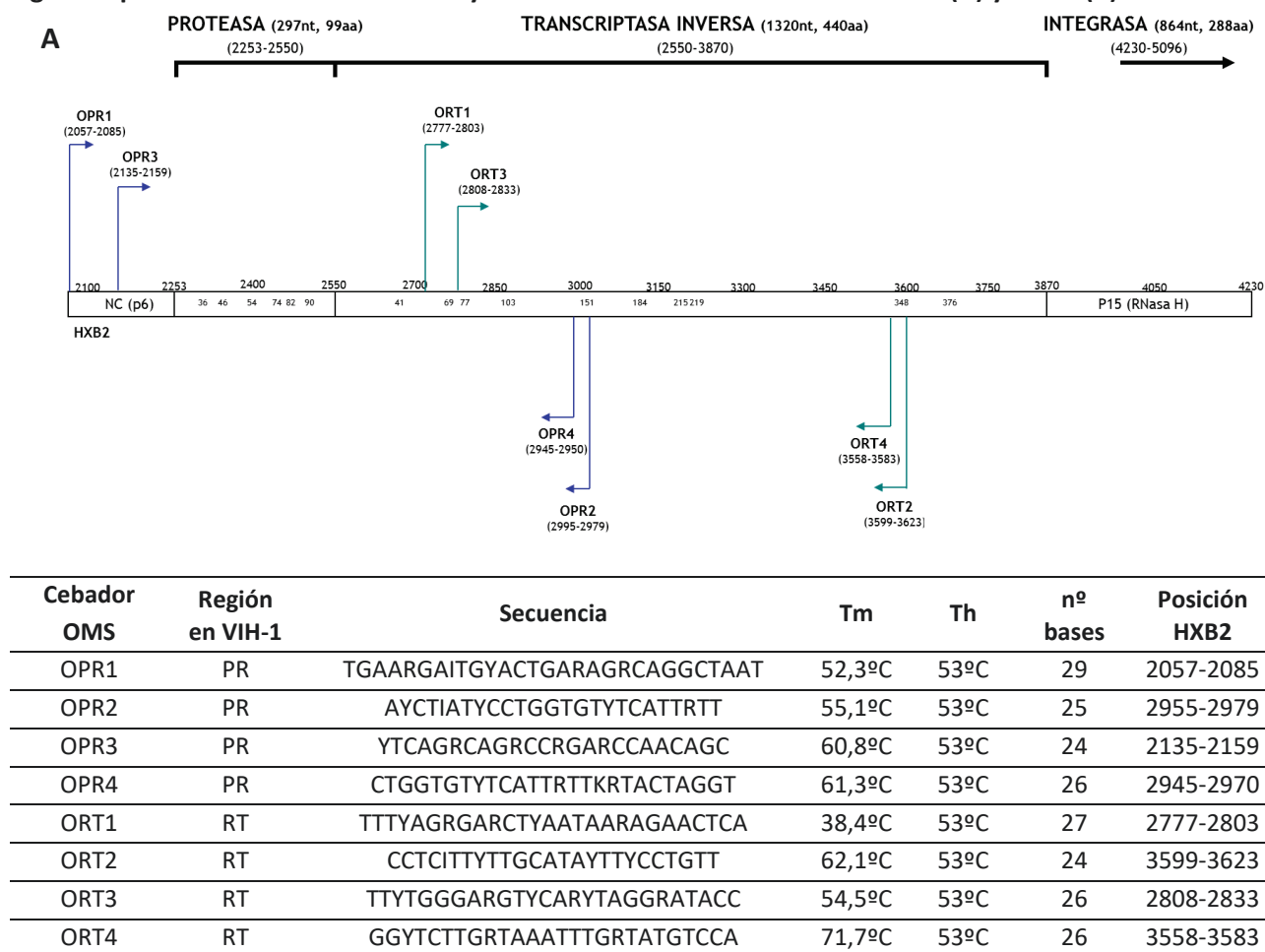
Otra carga viral en la madre si está disponible y fecha :

Otra información clínica útil:

Firma:

Fecha:



**Figura Suplementaria I.2. Localización y secuencia de los cebadores de la OMS (A) y ANRS (B).**

**Leyenda Figura Suplementaria I.2.** PR, proteasa; RT, retrotranscriptasa; IN, integrasa; nt, nucleótidos; aa, aminoácidos; Numeración referida al aislado de referencia de subtipo B HXB2 (nº acceso del Genbank K03455); Tm, temperatura de fusión o *melting*; Th, temperatura de hibridación; nº, número. Cebadores usados de la OMS<sup>91</sup> y ANRS<sup>198</sup>.

**Figura Suplementaria I.3. Mutaciones de resistencia (MDR) a las distintas familias de antirretrovirales en pacientes tratados según Stanford.**

Mutaciones de resistencia a los inhibidores de la RT análogos de nucleós(t)ido (ITIAN)												
	Non-TAMs					TAMs					MDR	
	184	65	70	74	115	41	67	70	210	215	219	69 151
Cons	M	K	K	L	Y	M	D	K	L	T	K	T Q
3TC	<u>VI</u>	R										Ins M
FTC	<u>VI</u>	R										Ins M
ABC	VI	<u>R</u>	E	<u>VI</u>	<u>F</u>	L			W	FY		Ins M
TFV	***	<u>R</u>	E		F	L		R	W	FY		Ins M
ZDV	***	***	*	*		L	N	R	W	FY	QE	Ins M

Mutaciones de resistencia a los inhibidores de la RT no análogos de nucleós(t)ido (ITINAN)									
	100	101	103	106	181	188	190	227	230
Cons	L	K	K	V	Y	Y	G	F	M
DOR	I	EP		<u>AM</u>	CIV	<u>L</u>	<u>SE</u>	<u>LC</u>	<u>L</u>
EFV	<u>I</u>	<u>EP</u>	<u>NS</u>	<u>AM</u>	CIV	<u>L</u>	<u>ASE</u>	<u>LC</u>	<u>L</u>
ETR	<u>I</u>	<u>EP</u>			<u>CIV</u>	<u>L</u>	<u>ASE</u>	<u>C</u>	<u>L</u>
RPV	<u>I</u>	<u>EP</u>			<u>CIV</u>	<u>L</u>	<u>ASE</u>	<u>C</u>	<u>L</u>
NVP	<u>I</u>	<u>EP</u>	<u>NS</u>	<u>AM</u>	<u>CIV</u>	<u>L</u>	<u>ASE</u>	<u>LC</u>	<u>L</u>

Mutaciones de resistencia a los inhibidores de la IN (INI)									
	66	92	118	138	140	143	147	148	155 263
Cons	T	E	G	E	G	Y	S	Q	N R
BIC	K	Q	<u>R</u>	KAT	SAC			<u>HRK</u>	H K
DTG	K	Q	<u>R</u>	KAT	SAC			<u>HRK</u>	H K
EVG	<u>AIK</u>	<u>Q</u>	<u>R</u>	KAT	<u>SAC</u>		<u>G</u>	<u>HRK</u>	<u>H</u> K
RAL	<u>AIK</u>	<u>Q</u>	<u>R</u>	KAT	<u>SAC</u>	<u>RC</u>		<u>HRK</u>	<u>H</u> K

Mutaciones de resistencia a los inhibidores de la PR (IP)									
	32	46	47	48	50	54	76	82	84 88 90
Cons	V	M	I	G	I	I	L	V	I N L
ATV/r	I	IL	V	<u>VM</u>	<u>L</u>	VTALM		ATFS	<u>V</u> <u>S</u> M
DRV/r	I		VA		V	LM	V	F	V
LPV/r	I	IL	<u>VA</u>	VM	V	VTALM	V	<u>AETS</u>	V M

**Leyenda Figura Suplementaria I.3.** Subrayado en negrita, susceptibilidad reducida de alto nivel (MDR primarias); negrita, susceptibilidad reducida (MDR secundarias); texto sin formato, susceptibilidad reducida en combinación con otras MDR (MDR accesorias); asterisco, mayor susceptibilidad; TAM, mutaciones del análogo de timidina; Ins, inserción; ATV/r, Atazanavir/ritonavir; DRV/r, Darunavir/ritonavir; LPV/r, Lopinavir/Ritonavir; ABC, Abacavir; ZDV, Zidovudina; FTC, Emtricitabina; 3TC, Lamivudina; TFV, Tenofovir; DOR, Doravirina; EFV, Enfavirez; ETR, Etravirina; NVP, Nevirapina; RPV, Rilpivirina; BIC, Bictegravir; DTG, Dolutegravir; EVG, Elvitegravir; RAL, Raltegravir. Más información en <https://cms.hivdb.org/prod/downloads/resistance-mutation-handout/resistance-mutation-handout.pdf>.

**Tabla Suplementaria I.1. Secuencias de cebadores usados en RT-qPCR para medir los marcadores inmunes del Capítulo 4.**

<b>Gen</b>	<b>Cebador directo (5'-3')</b>	<b>Cebador reverso(5'-3')</b>
<b>β-ACTIN</b>	GTGGGGCGCCCCAGGCACCA	CTCCTTAATGTCACGCACGATTC
<b>B7.1</b>	GGGAAATGTCGCCTCTCTGA	TGTGGATTTAGTTTCACAGCTTGC
<b>B7-H5 (VISTA)</b>	CGTCCCTAGGTCCGGTGG	TGCGGTACCACGTCTTGTA
<b>CD14</b>	CTGCAACTTCTCCGAACCTC	TAGGTCCTCGAGCGTCAGTT
<b>CD163</b>	CAGCGGCTTGCAAGTTCTCTC	GGCCTCCTTTCCATTCCAGAAA
<b>HIF-1α</b>	TTCCAGTTACGTTCTTCGATCA	TTTGAGGACTTGCCTTTCA
<b>HVEM (TNFRSF14)</b>	GTGCAGTCCAGGTTATCGTGT	CACTTGCTTAGGCCATTGAGG
<b>IRAK-M</b>	TTTGAATGCAGCCAGTCTGA	GCATTGCTTATGGAGCCAAT
<b>Galectin-9 (HUAT)</b>	TCTGGGACTATTCAAGGAGGTC	CCATCTTCAAACCGAGGGTTG
<b>PD-L1 (CD274)</b>	TGGCATTGCTGAACGCATTT	TGCAGCCAGGTCTAATTGTTTT
<b>Siglec-10</b>	CCAAAAAGGCCAGTTCCTGC	GTGCCGTTCCCAAGGTTTTTC

# Anexo II

# **Material suplementario del Capítulo 1**

**Tabla Suplementaria II.1. Sobreestimación de la CV considerando los ensayos cuantitativos y las variantes del VIH-1 definidas por análisis filogenético.**

CV en DBS	Número de los 78 DBS	Variantes del VIH-1
Mayor por Xpert-CV	54 (69,2%)	2C, 2H, 1CRF05_DF, 1CRF11_cpx, 1CRF18_cpx, 1CRF25_cpx, 2CRF27_cpx, 1CR45_cpx, 26URF, 17 sin secuencia
Mayor por Xpert-CV (>0,5 log)	11 total (14,1%) 11/54 sobreestimados (20,3%)	1C, 2H, 1CRF11_cpx, 1CRF27_cpx, 5URF, 1 sin secuencia
Mayor por Roche-CV	23 (29,5%)	1H, 1J, 1CRF19_cpx, 2CR45_cpx, 15 URFs, 3 sin secuencia
Mayor por Roche-CV (>0,5log)	1 total (1,3%) 1/23 sobreestimados (4,3%)	1CRF45_cpx
Casos totales con diferencias de CV >0,5 log entre ensayos	12 (15,4%)	1C, 2H, 1CRF11_cpx, 1CRF27_cpx, 1CRF45_cpx, 5URF, 1 sin secuencia

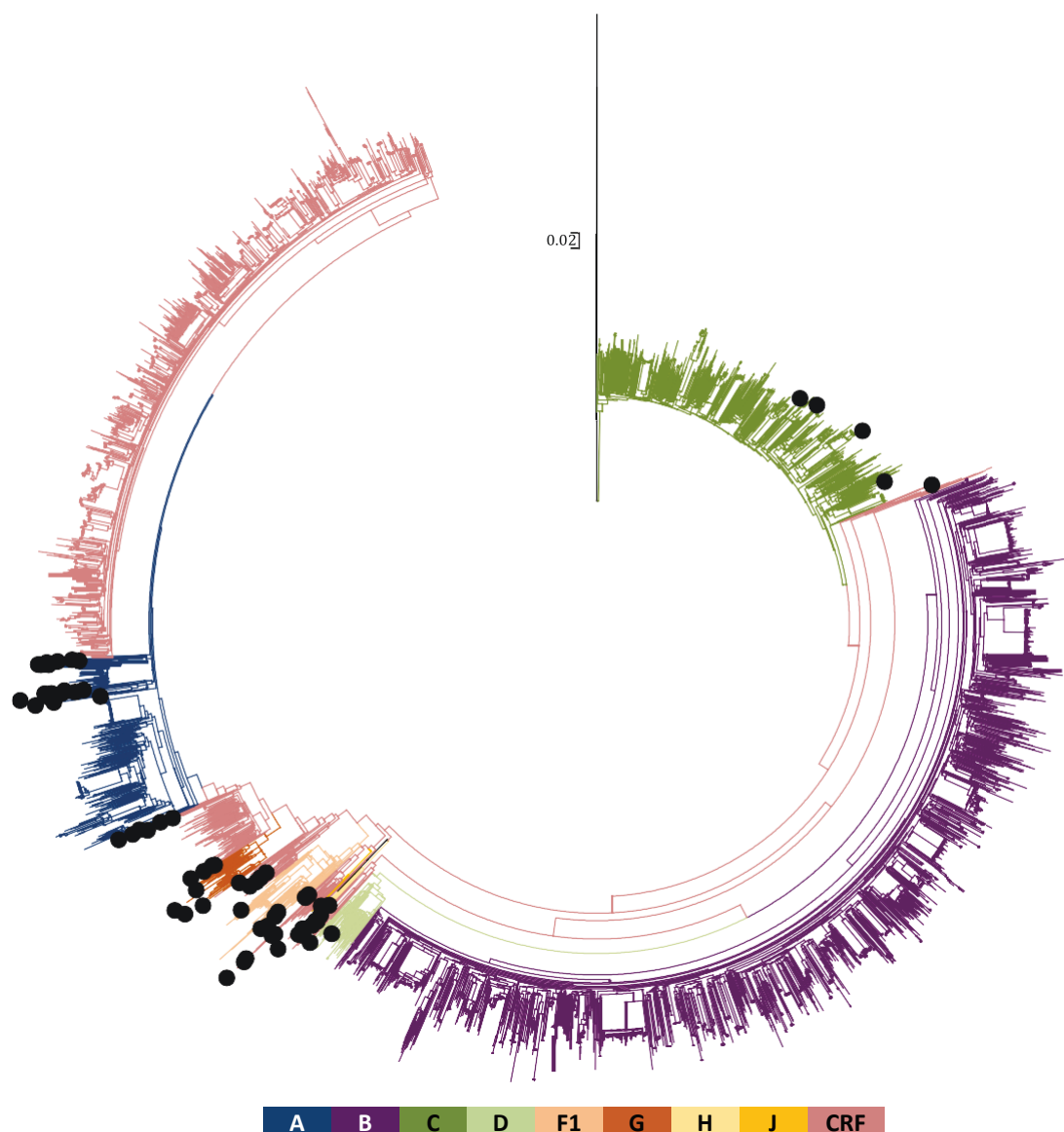
**Leyenda Tabla Suplementaria II.1.** CV, carga viral; phy, análisis filogenético; DBS, *dried blood spots* o muestra de sangre seca; CRF, formas recombinantes circulantes; URF, formas recombinantes únicas.

# Anexo III

# **Material suplementario del Capítulo 2**

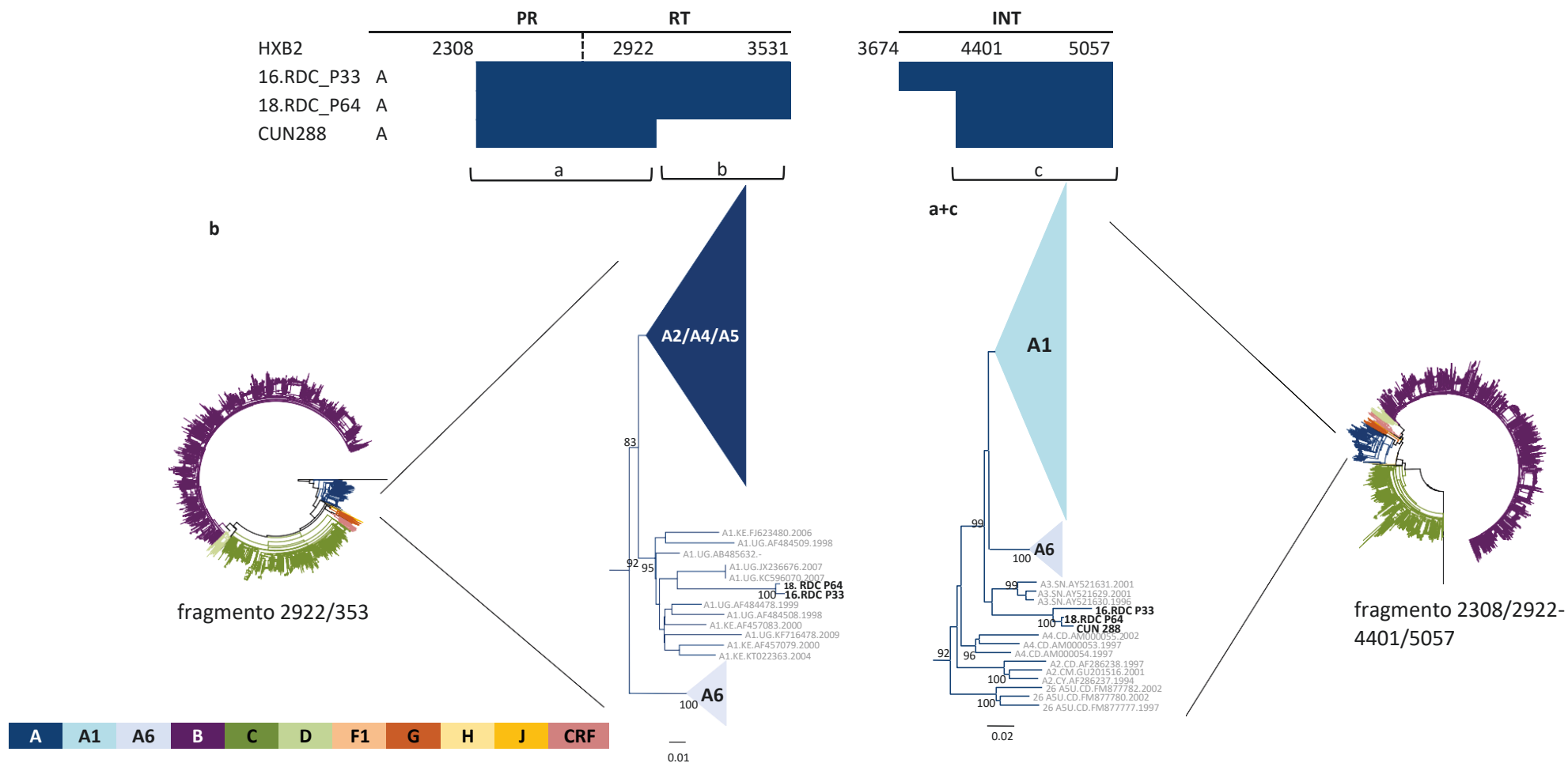


**Figura Suplementaria III.1. Árbol filogenético que incluye 66 secuencias *pol* adscritas a subtipos puros en *pol* de DBS recolectados en 2016-2018 en Kinshasa y 5.672 secuencias de referencia de LANL.**



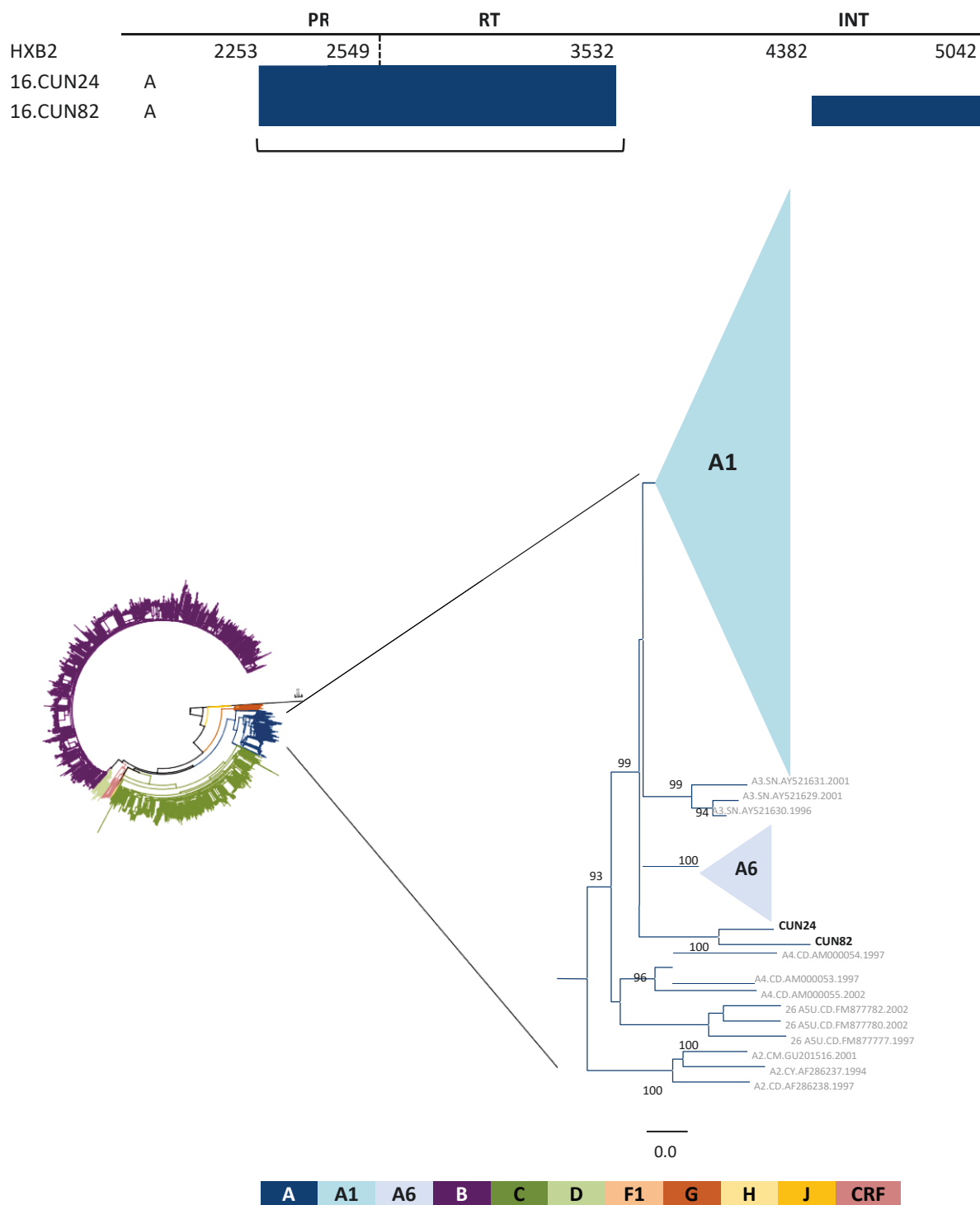
**Leyenda Figura Suplementaria III.1.** Árbol filogenético usando secuencias parciales de *pol* (1.127nts) reconstruidas por el método de máxima verosimilitud (ML) con RAxML v8.0 usando el tiempo general reversible más la proporción de sitios invariables más el modelo evolutivo del parámetro de distribución gamma (GTR+I+G) generado con el software MEGA6 (<https://www.megasoftware.net/>), como se informa en la sección de métodos. Los círculos marcan nuestras 66 muestras atribuidas a subtipos puros de VIH-1 en *pol* recolectados recientemente en Kinshasa (2016-2018). En azul, subtipo A y subtipos A1-A6.

**Figura Suplementaria III.2. Cluster de transmisión número 1 identificado por árbol de máxima verosimilitud y modelo evolutivo GTR+I+G incluyendo un niño, un adolescente y una mujer de Kinshasa.**



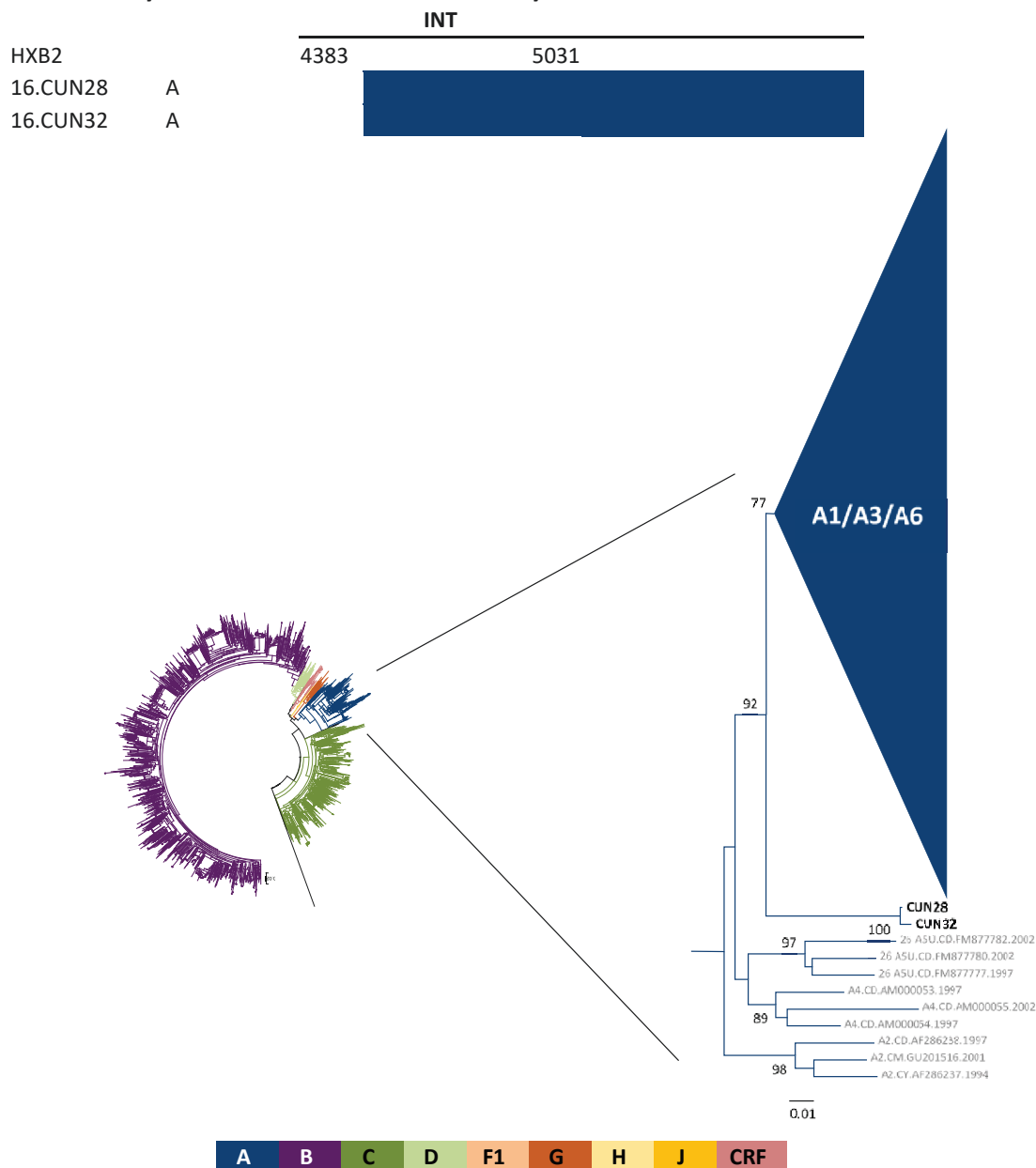
**Leyenda Figura Suplementaria III.2.** Árbol PhyML usando secuencias parciales de *pol* de 3 pacientes que pertenecen al *cluster* de transmisión 1, incluyendo 4.090 secuencias referencia *pol* de RDC depositadas en LANL asignadas a subtipos puros del VIH-1. La figura ha sido generada con el *software* MEGA6 (<https://www.megasoftware.net/>). Datos epidemiológicos conocidos están incluidos en la **Tabla 2.2**.

**Figura Suplementaria III.3.** *Cluster* de transmisión número 2 identificado por árbol de máxima verosimilitud y modelo evolutivo GTR+I+G incluyendo dos adultos de Kinshasa.



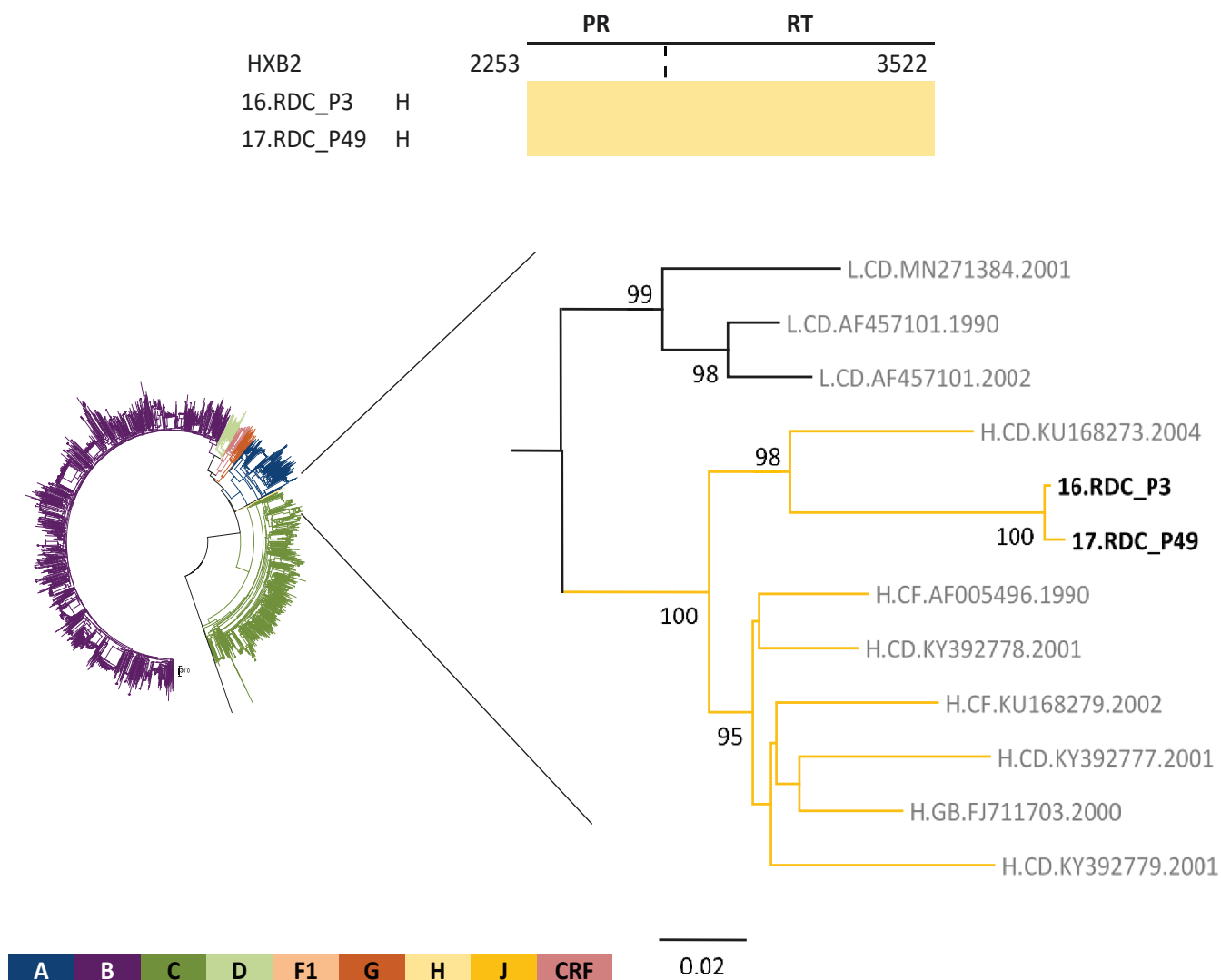
**Leyenda Figura Suplementaria III.3.** Árbol PhyML usando secuencias parciales de *pol* (1.279 nts) de los pacientes CUN24 y CUN82 que pertenecen al *cluster* de transmisión 2, incluyendo 4.090 secuencias de referencia *pol* de RDC depositadas en LANL asignadas a subtipos puros del VIH-1. Generada con MEGA6 (<https://www.megasoftware.net/>). Datos epidemiológicos conocido están incluidos en la **Tabla 2.2**

Figura Suplementaria III.4. *Cluster* de transmisión número 3 identificado por árbol de máxima verosimilitud y modelo evolutivo GTR+I+G incluyendo dos adultos de Kinshasa.



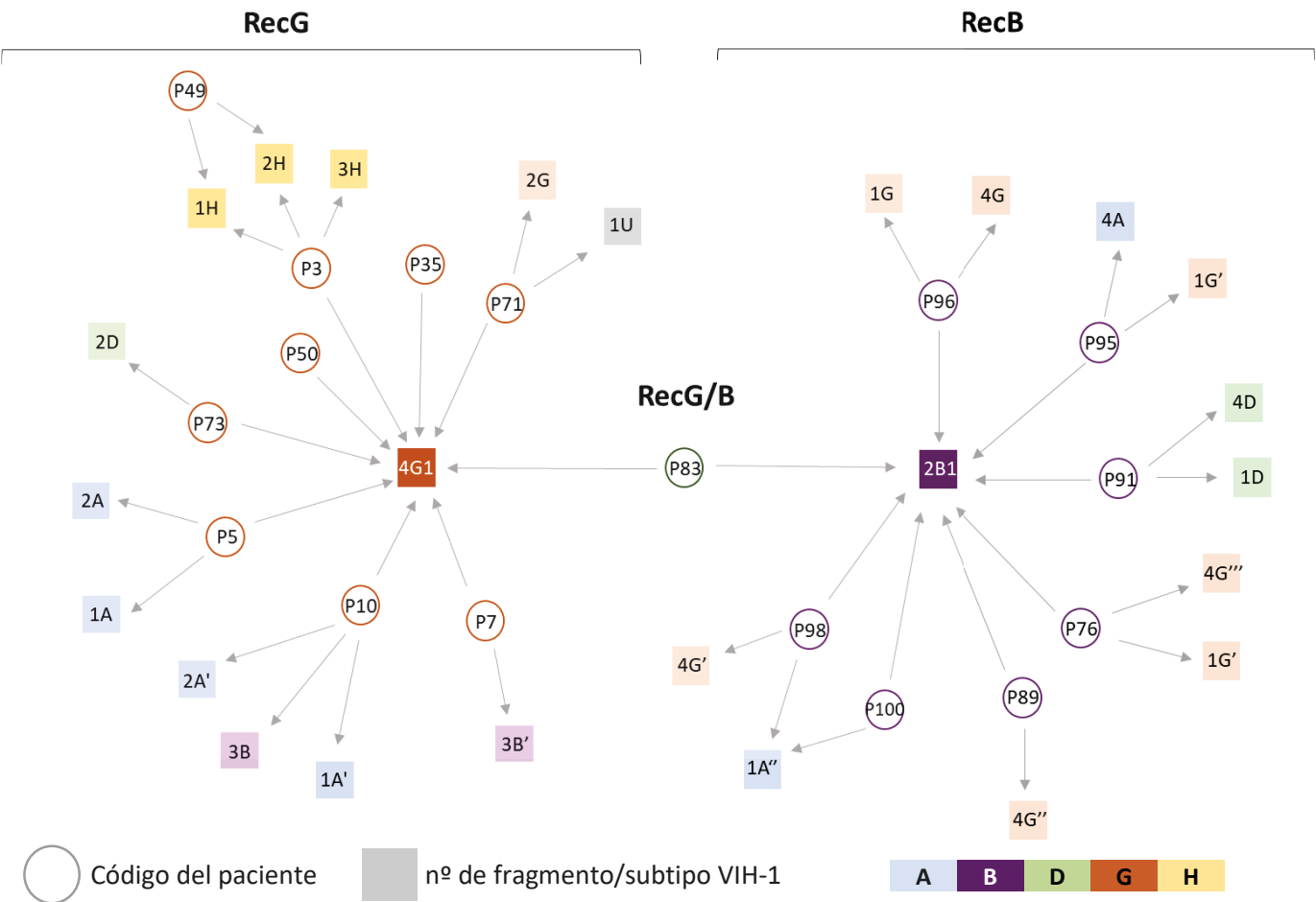
**Leyenda Figura Suplementaria III.4.** Árbol PhyML usando secuencias parciales de pol (648 nts) de los pacientes CUN28 y CUN32 que pertenecen al *cluster* de transmisión 3, incluyendo 4.090 secuencias referencia pol de RDC depositadas en LANL asignadas a subtipos puros del VIH-1. La figura ha sido generada con el *software* MEGA6 (<https://www.megasoftware.net/>). Datos epidemiológicos conocidos están incluidos en la **Tabla 2.2**

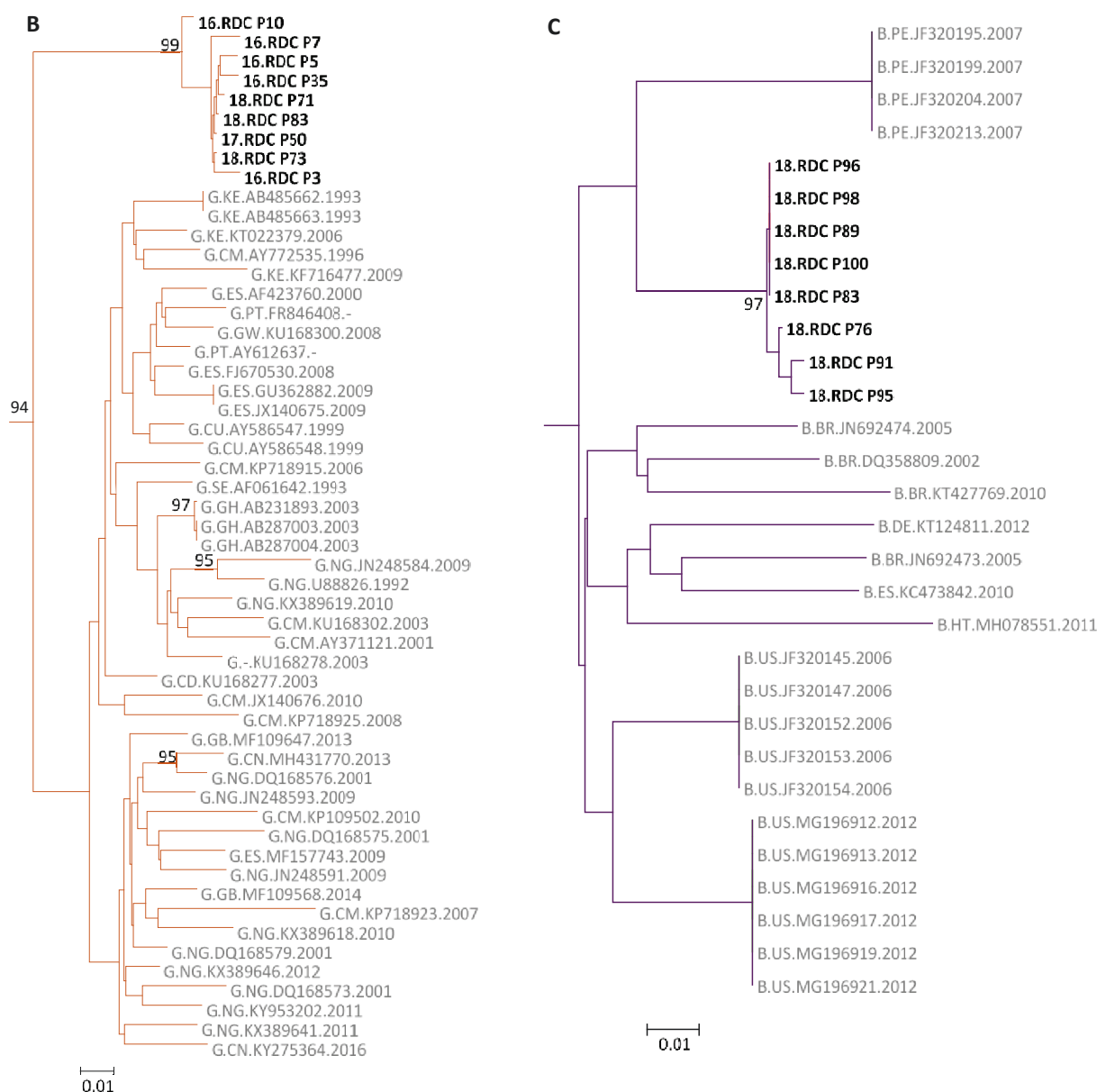
**Figura Suplementaria III.5. Cluster de transmisión número 4 identificado por árbol de máxima verosimilitud y modelo evolutivo GTR+I+G incluyendo dos niños de Kinshasa.**



**Leyenda Figura Suplementaria III.5.** Árbol PhyML usando secuencias parciales de *pol* (1.269 nts) de los pacientes 16.RDC\_P3 y 17.RDC\_P49 que pertenecen al cluster de transmisión 4, incluyendo 4.090 secuencias referencia *pol* de RDC depositadas en LANL asignadas a subtipos puros del VIH-1. La figura ha sido generada con el software MEGA6 (<https://www.megasoftware.net/>). Datos epidemiológicos conocidos están incluidos en la **Tabla 2.2**

Figura Suplementaria III.6. Red de transmisión de recombinación de 17 pacientes pediátricos de Kinshasa (2016-2018).

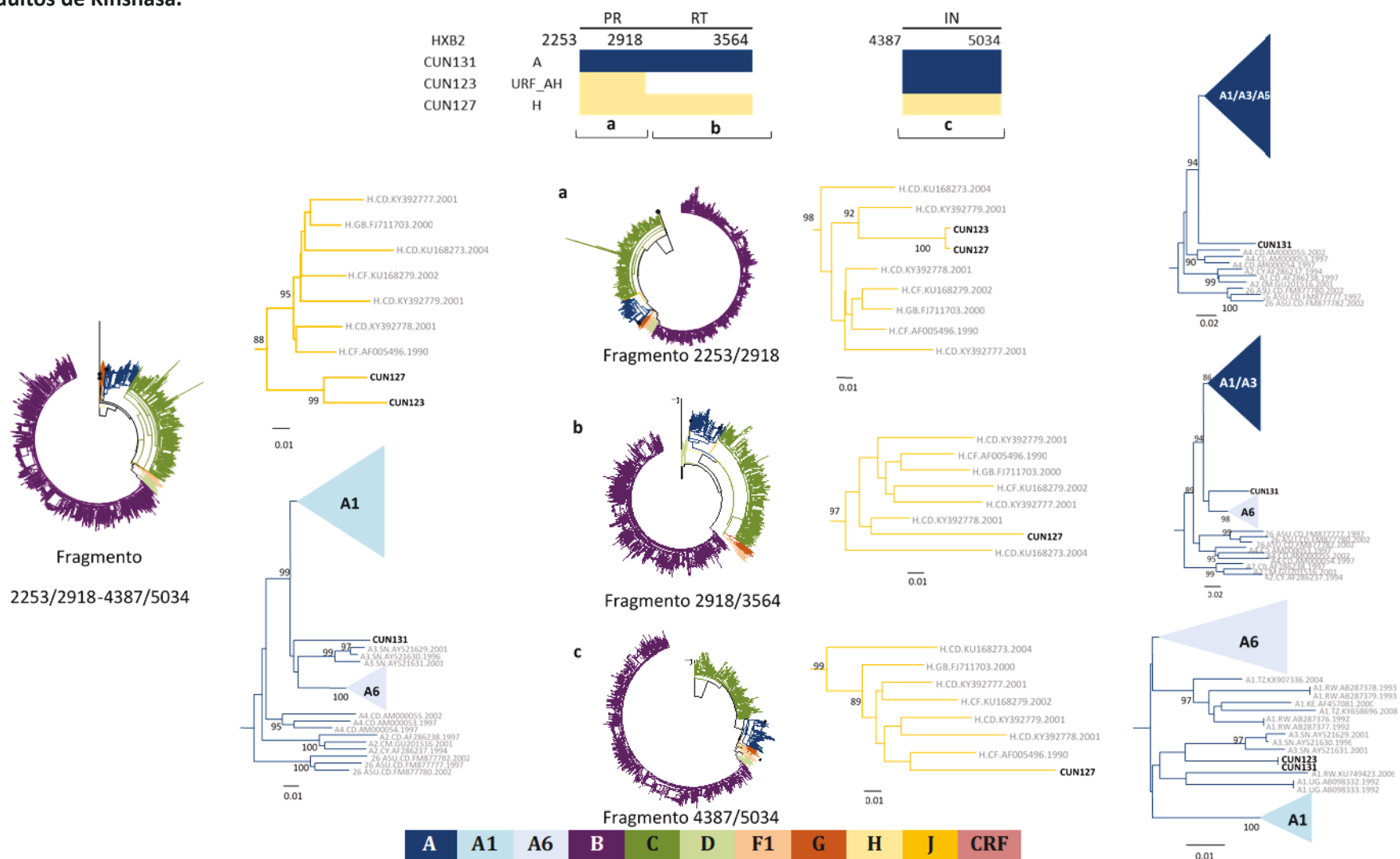




**Leyenda Figura Suplementaria III.6.** A. Red de transmisión de recombinación. B. Árbol PhyML de RecG, utilizando secuencias parciales de *pol* (615 nt, HXB2 4390-5005) de 9 niños y adolescentes, incluyendo 4.090 secuencias de LANL de referencia *pol* de RDC atribuidas a subtipos puros de VIH-1. C. Árbol PhyML de RecB, utilizando secuencias parciales de *pol* (599 nt, HXB2 2935-3534) 8 niños y adolescentes, incluyendo 4.090 secuencias de referencia *pol* disponibles en LANL de RDC adscritas a subtipos puros de VIH-1. Círculos de colores, secuencias *pol* de pacientes involucradas en la red de recombinación que comparten fragmentos de subtipo G (RecG) y/o B (RecB) de *pol* respaldados por valores de bootstrap >80% en árboles PhyML. En cuadrados coloreados, los números se refieren al fragmento *pol* analizado (numeración según HXB2): 1, posiciones 2253-2934 (proteasa); 2, posiciones 2935-3534 (retrotranscriptasa); 3, posiciones 3704-4389 (retrotranscriptasa); 4, posiciones 4390-5005 (integrasa); las letras se refieren a la variante del VIH-1: A, subtipo A; B, subtipo B; D, subtipo D; G, subtipo G; H, subtipo H; U, desconocido. Para distinguir los fragmentos del mismo subtipo que no pertenecen al mismo ancestro, se agrega un superíndice. La figura se generó con el software MEGA6 (<https://www.megasoftware.net/>). Los datos epidemiológicos conocidos de los sujetos se informan en la **Tabla 2.3**.

# ANEXO III

**Figura Suplementaria III.7. Evento de recombinación identificado por máxima verosimilitud (PhyML) y el modelo evolutivo GTR+I+G con virus de 3 pacientes adultos de Kinshasa.**



**Leyenda Figura Suplementaria III.7.** Árbol PhyML usando secuencias parciales de *pol* (1.312 nt) de 3 adultos incluyendo 4.090 secuencias *pol* de referencia disponibles en LANL de RDC adscritas como subtipos puros del VIH-1. La figura ha sido generada con el software MEGA6 (<https://www.megasoftware.net/>).



Tabla Suplementaria III.1. Resumen de publicaciones con caracterización de variantes del VIH-1 de RDC.

Estudio	Localización en RDC	Año de las muestras	Tipo de muestra	Grupo de población	Método de subtipaje	Nº seq	Región genética del VIH	Secuencias disponibles en GenBank
<b>Potts 1993</b> <sup>224</sup>	Kinshasa	-	PBMC	Mujeres embarazadas	Phy	14	<i>env (C2V3)</i>	No
<b>Mokili 1999</b> <sup>278</sup>	Kimpese	1988-1994	Sangre, plasma y PBMC	Madres y niños	Phy	66	<i>gag (p17)</i>	No
<b>Vidal 2000A</b> <sup>226</sup>	Kinshasa, Bwamanda, Mbuyi-Maya	1997	PBMC	Trabajadoras sexuales, pacientes con TB, embarazadas y donantes de sangre	Phy	247	<i>env (V3-V5, gp160), gag (p24)</i>	Sí
<b>Vidal 2000B</b> <sup>225</sup>	Kinshasa	1997	PBMC	Paciente con TB Mujer embarazada	Phy	2	Genoma casi completo	Sí
<b>Triques 2000</b> <sup>280</sup>	-	-	-	-	Phy	1	Genoma casi completo	Sí
<b>Yang 2001</b> <sup>281</sup>	Kinshasa	1985	Plasma	Trabajadoras sexuales	Phy	24	<i>gag (p24), env (C2V3, gp41)</i>	Sí
<b>Gao 2001</b> <sup>282</sup>	Kinshasa	1983	PBMC	Pacientes con sida	Phy	1	<i>gag, pol, env, nef</i>	Sí
<b>Mokili 2002</b> <sup>279</sup>	Kinshasa, Kimpese	1983 1990	PBMC	Pacientes con sida Bebé de 12 meses	Phy	2	Genoma completo	Sí
<b>Kita 2004</b> <sup>283</sup>	Likasi	2001	PBMC	-	Phy	24	<i>pol (IN), env (C2V3, gp41)</i>	Sí
<b>Yang 2005</b> <sup>229</sup>	Kinshasa	1985 1999-2000	Plasma	Trabajadoras sexuales Pacientes ITS y TB	Phy	24 83	<i>gag (p24)</i> <i>env (C2V3, gp41)</i>	Sí
<b>Vidal 2005</b> <sup>284</sup>	Kinshasa, Mbuji-Mayi, Lubumbashi, Kisangani	2002	PBMC	-	Phy	288	<i>env (V3-V5)</i>	Sí
<b>Vidal 2006A</b> <sup>285</sup>	Kinshasa, Mbuji-Mayi, Lubumbashi, Kisangani	2002	PBMC	Población centinela	Phy	70	<i>pol (PR,RT), env (V3-V5)</i>	Sí
<b>Vidal 2006B</b> <sup>286</sup>	Kinshasa	1997 2002	PBMC	Paciente con TB	Phy	3	Genoma casi completo	Sí
<b>Worobey 2008</b> <sup>223</sup>	Kinshasa	1960	Biopsia nódulo linf.	Mujer adulta	Phy	1	<i>gag, pol, env (small fragments)</i>	Sí
<b>Vidal 2008</b> <sup>227</sup>	Lubumbashi	2002	PBMC	-	Phy	1	Genoma casi completo	Sí*

## ANEXO III

Estudio	Localización en RDC	Año de las muestras	Tipo de muestra	Grupo de población	Método de subtipaje	Nº seq	Región genética del VIH	Secuencias disponibles en GenBank
<b>Vidal 2009</b> <sup>287</sup>	Kinshasa, Mbuyi-Mayi, Lubumbashi	1997-2002	PBMC	Pacientes ITS, ACP, sida, y TB	Phy	8	Genoma casi completo	Sí
<b>Niama 2009</b> <sup>288</sup>	-	1997	PBMC	-	Phy.	2	Genoma completo	Sí*
<b>Huang 2009</b> <sup>289</sup>	-	1996	PBMC	Pacientes asintomáticos	Phy	2	Genoma completo	Sí
<b>Djoko 2011</b> <sup>228</sup>	Kinshasa	2007	Plasma	Militares	Phy	94	<i>pol (PR, RT)</i>	Sí
<b>Muwonga 2011</b> <sup>290</sup>	Kinshasa, Matadi, Lubumbashi, Mbuji-Mayi	2008	Plasma	Pacientes con TAR Pacientes naive	Phy	93	<i>pol (PR, RT)</i>	Sí
<b>Kamangu 2015</b> <sup>291</sup>	Kinshasa	2013-2014	Plasma	Pacientes naive	Herramienta de subtipaje online	153	<i>pol (PR, RT)</i>	No
<b>Boillot 2016</b> <sup>292</sup>	Nord Kivu	2011-2012	DBS	Pacientes con TAR	Phy	55	<i>pol (PR, RT)</i>	Sí
<b>Rodgers 2017</b> <sup>273</sup>	Bandundu, Kananga	2001-2003	Plasma	Voluntarios Mujeres embarazadas	Herramienta de subtipaje online + Phy	172 14	<i>env (gp41)</i> Genoma completo	Sí
<b>Villabona 2017</b> <sup>293</sup>	Kinshasa, Mbuyi Mayi, Nord-Kivu	2008-2012	DBS o plasma	-	Phy	8	Genoma completo	Sí
<b>Faria 2019</b> <sup>272</sup>	Kinshasa, Matadi, Mbuji-Mayi, Lubumbashi	2008	Plasma	Pacientes con TAR	Phy	346	<i>pol (PR, RT)</i>	Sí
<b>Rubio-Garrido 2019</b> <sup>89</sup>	Kinshasa	2016	DBS	Niños y adultos	Phy	58	<i>pol (PR, RT, IN)</i>	Sí
<b>Yamaguchi 2020</b> <sup>17</sup>	Kananga	2001	Plasma	-	Phy	1	Genoma completo	Sí
<b>Kwon 2020</b> <sup>30</sup>	Kinshasa, Bukavu, Goma, Kananga, Kindu, Kikwit, Kisangani, Matadi, Lubumbashi, Mbandaka, Mbuji-Mayi	2012	DBS	Trabajadoras sexuales	Herramienta de subtipaje online + Phy	60 145	<i>pol (PR, RT)</i> <i>env (C2, V4)</i>	Sí
<b>Estudio actual</b>	<b>Kinshasa</b>	<b>2016-2018</b>	<b>DBS</b>	<b>Niños, adolescentes y adultos</b>	<b>Phy</b>	<b>165</b>	<b><i>pol (PR, RT, IN)</i></b>	<b>Sí</b>

---

**Leyenda Tabla Suplementaria III.1.** RDC, República Democrática del Congo; DBS, dried blood *spots* o muestras de sangre seca; DPS, dried plasma spots o muestras de plasma seco; guión, dato desconocido; ITS, infecciones de transmisión sexual; ACP, asistente de la clínica prenatal; TB, tuberculosis; TAR, tratamiento antirretroviral; SIDA; síndrome de inmunodeficiencia adquirida, PBMC, peripheral blood mononuclear cells o células mononucleares de sangre periférica; Phy, análisis filogenético de secuencias virales; Nº, número; PR, proteasa; RT; retrotranscriptasa; IN, integrasa. GenBank, base de datos de secuencias GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>); EMBL, base datos de nucleótidos y secuencias EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>). \*La mayoría de los estudios tiene sus secuencias disponibles en Genbank y 2 en EMBL (con asterisco). El número en súper índice indica la referencia de casa artículo.

# Anexo IV

# Material suplementario del Capítulo 3

**Tabla Suplementaria IV.1. Pacientes portadores de MDR a familias de ARV en la población de estudio: niños (0-14 años), adolescentes (15-21 años) y total.**

	Sec. Total	MDR Totales n (%)	Solo Major- MDR n (%)	Major-MDR+Minor MDR a INI n (%)	Sec. niño	Niños n (%)	Sec. adolescente	Adolescentes n (%)
<b>Resistencia simple</b>	55	7 (12,7)	7 (12,7)	7 (12,7)	27	2 (7,4)	28	5 (17,9)
A ITIAN	49	0	0	0	23	0	26	0
A ITINAN	49	6 (12,2)	7 (14,3)	6 (12,2)	23	2 (8,7)	26	4 (15,4)
A IP	36	0	0	0	18	0	18	0
A INI	40	1 (2,5)	0	1 (2,5)	22	0	18	1 (5,6)
<b>Resistencia doble</b>	55	24 (43,6)	26 (47,3)	24 (43,6)	27	13 (46,4)	28	10 (35,7)
ITIAN+ITINAN	49	22 (44,9)	26 (53,1)	22 (44,9)	23	12 (42,8)	26	10 (38,5)
ITIAN+INI	34	1 (2,9)	0	1 (2,9)	18	0	16	1 (6,3)
ITINAN+INI	34	1 (2,9)	0	1 (2,9)	18	1 (5,6)	16	0
<b>Resistencia triple</b>	55	6 (10,9)	3 (5,5)	5	27	3 (11,1)	28	3 (10,7)
ITIAN+ITINAN+IP	36	4 (11,1)	3 (8,5)	3 (8,5)	18	2 (7,1)	18	2 (11,1)
ITIAN+ITINAN+INI	34	2 (5,9)	0	2 (5,9)	18	1 (3,6)	16	1 (6,3)
<b>Resistencia cuádruple</b>	55	1 (1,8)	0	1 (1,8)	27	0	28	1 (3,6)
IP+ITIAN+ITINAN+INI	26	1 (3,8)	0	1 (3,8)	15	0	11	1 (9,1)
<b>Resumen de resistencias a las familias de ARV</b>								
<b>No MDR</b>	55	17 (31)	18 (32,7)	17 (31)	27	9 (33,3)	28	8 (28,6)
ITIAN	49	30 (61,2)	30 (61,2)	30 (61,2)	23	15 (65,2)	26	15 (57,7)
ITINAN	49	36 (73,5)	36 (73,5)	36 (73,5)	23	18 (78,3)	26	18 (69,2)
IP	36	5 (13,9)	3 (8,3)	3 (8,3)	18	2 (11,1)	18	3 (16,7)
INI	40	6 (15)	0	6 (15)	22	2 (9,1)	18	4 (22,2)

**Leyenda Tabla Suplementaria IV.1.** n, número de pacientes; sec., secuencias; IP, inhibidores de proteasa; ITIAN, inhibidores de la retrotranscriptasa análogos de nucleós(t)idos; ITINAN, inhibidores de la retrotranscriptasa no análogos de nucleós(t)idos; INI, inhibidores de la integrasa; MDR, mutación de resistencia a fármacos; ARV, fármacos antirretrovirales.

**Tabla Suplementaria IV.2. Mutaciones de Resistencia en niños (0-14 años) y adolescentes (15-21 años) con secuencias disponibles.**

	Niños Sec=27 (%)	Adolescentes Sec=28 (%)	TOTAL Sec=55 (%)
<b>MDR a ITIAN</b>	<b>15 (65,2)</b> Sec=23	<b>15 (57,7)</b> Sec=26	<b>30 (61,2)</b> Sec=49
M184V	11 (47,8)	11 (42,3)	22 (44,9)
T215Y/F	3/1 (17,4)	2/1 (11,5)	7 (14,3)
K70R/N	2/1 (13)	4 (15,4)	6/1 (14,3)
M41L	5 (21,7)	1 (3,8)	6 (12,2)
L210W	4 (17,4)	2 (7,7)	6 (12,2)
E44D	3 (13)	1 (3,8)	4 (8,2)
D67N/E/G	2/1/0 (13)	0/0/1 (3,8)	2/1/1 (8,2)
K65R	1 (4,3)	1 (3,8)	2 (4,1)
L74I	2 (8,7)	0	2 (4,1)
K219N/E	0/1 (4,3)	1/0 (3,8)	1/1 (4,1)
T69D	1 (4,3)	0	1 (2)
<b>MDR a ITINAN</b>	<b>18 (78,3)</b> Sec=23	<b>18 (69,2)</b> Sec=26	<b>36 (73,5)</b> Sec=49
K103N/H/S	9/1/0 (13)	10/0/1 (42,3)	19/1/1 (42,9)
Y181C	6 (26,1)	6 (23,1)	12 (24,5)
G190A	4 (17,4)	8 (30,8)	12 (24,5)
V108I	6 (26,1)	3 (11,5)	9 (18,4)
K101E/H	4/0 (17,4)	3/2 (19,2)	7/2 (18,4)
H221Y	3 (13)	3 (11,5)	6 (12,2)
V106I	3 (13)	3 (11,5)	6 (12,2)
L100I/V	1/0 (4,3)	2/1 (11,5)	3/1 (8,2)
A98G	2 (8,7)	1 (3,8)	3 (6,1)
Y318F	1 (4,3)	1 (3,8)	2 (4,1)
K238T	1 (4,3)	1 (3,8)	2 (4,1)
Y188L, F227L, P225H	0	1 (3,8)	1 (2)
<b>MDR a IP</b>	<b>2 (11,1)</b> Sec=18	<b>3 (16,7)</b> Sec=18	<b>5 (13,9)</b> Sec=36
<b>Primarias</b>	<b>1 (5,6)</b>	<b>2 (11,1)</b>	<b>3 (8,3)</b>
M46I	1 (5,6)	2 (11,1)	3 (8,3)
I54V	1 (5,6)	1 (5,6)	2 (5,6)
I50V, I84V	0	1 (5,6)	1 (2,8)
I47V, V82M	1 (5,6)	0	1 (2,8)
<b>Secundarias</b>	<b>2 (11,1)</b>	<b>1 (5,6)</b>	<b>3 (8,3)</b>
K43T	2 (11,1)	0	2 (5,6)
L10F, I47L, Q58E, N83D	0	1 (5,6)	1 (2,8)
<b>MDR secundarias a INI</b>	<b>2 (9,1)</b> Sec=22	<b>4 (22,2)</b> Sec=18	<b>6 (15)</b> Sec=40
E157Q	0	2 (11,1)	2 (5)
T97A	1 (4,5)	1 (5,6)	2 (5)
Q95K, G140GR	1 (4,5)	1 (5,6)	1 (2,5)

**Leyenda Tabla Suplementaria IV.2.** Sec., secuencias; IP, inhibidores de la proteasa; ITIAN, inhibidores de la retrotranscriptasa análogos de nucleós(t)idos; ITINAN, inhibidores de la retrotranscriptasa no análogos de nucleós(t)idos; INI, inhibidores de la integrasa; MDR, mutación de resistencia a fármacos; ARV, fármacos antirretrovirales.

Figura Suplementaria IV.1. Susceptibilidad a antirretrovirales por Stanford en 27 niños (0-14) y 28 adolescentes (15-21) con secuencia disponible.

	ID	Inhibidores de Proteasa (IP)							Inhibidores de retrotranscriptasa análogos de nucleós(t)idos (ITIAN)							Inhibidores de retrotranscriptasa no análogos de nucleós(t)idos (ITINAN)					Inhibidores de Integrasa (INI)				
		ATV/r	DRV/r	FPV/r	IDV/r	LPV/r	NFV	SQV/r	TPV/r	ABC	AZT	D4T	DDI	FTC	3TC	TDF	DOR	EFV	ETR	NVP	RPV	BIC	DTG	EVG	RAL
NIÑOS (0-14)	16.RDC_P3										*			*	*	*		*		*	*				
	16.RDC_P5										*			*	*	*		*		*	*				
	16.RDC_P9										*				*					*	*				
	16.RDC_P10										*			*	*	*		*		*	*				
	16.RDC_P34										*				*	*		*		*	*				
	16.RDC_P35										*				*	*		*			*				
	16.RDC_P44										*				*	*				*	*				
	17.RDC_P45										*			*	*	*		*		*	*				
	17.RDC_P47										*				*	*		*		*	*				
	17.RDC_P48										*			*	*	*		*		*	*				
	17.RDC_P49										*			*	*	*		*		*	*				
	17.RDC_P50										*				*	*				*	*				
	17.RDC_P51										*				*	*		*		*	*				
	17.RDC_P52										*			*	*	*		*		*	*				
	17.RDC_P53										*			*	*	*		*		*	*				
	17.RDC_P58										*				*	*				*	*				
	18.RDC_P64										*				*	*				*	*				
	18.RDC_P74					*					*		*	*	*	*		*		*	*				
18.RDC_P75										*	*			*	*		*	*	*	*					
18.RDC_P76										*	*	*	*		*	*	*	*	*	*			*	*	





18.RDC_P83										*				*	*		*		*						
18.RDC_P85											*	*			*	*		*		*					
18.RDC_P89										*	*			*	*		*		*			*			
18.RDC_P90											*			*	*		*		*		*				
18.RDC_P96											*	*		*	*		*		*		*				
18.RDC_P98											*			*	*		*		*		*				
18.RDC_P99											*			*	*		*		*		*				
18.RDC_P100											*			*	*		*		*		*				
18.RDC_P101														*	*		*		*		*				
18.RDC_P103											*			*	*		*		*		*				



**Leyenda Figura Suplementaria IV.1.** \*Experiencia al fármaco ARV. Los códigos de identificación de los pacientes se proporcionaron en el laboratorio después de la recepción de la muestra para mantener su anonimato. ATV/r, Atazanavir/ritonavir; DRV/r, Darunavir/ritonavir; FPV/r, Fosamprenavir/ritonavir; IDV/r, Indinavir/ritonavir; LPV/r, Lopinavir/Ritonavir; NFV, Nelfinavir; SQV/r, Saquinavir/ritonavir; TPV/r Tipranavir/ritonavir; ABC, Abacavir; AZT, Zidovudina; D4T, Estavudina; DDI, Didanosina; FTC, Emtricitabina; 3TC, Lamivudina; TDF, Tenofovir; DOR, Doravirina; EFV, Efavirenz; ETR, Etravirina; NVP, Nevirapina; RPV, Rilpivirina; BIC, Bictegravir; DTG, Dolutegravir; EVG, Elvitegravir; RAL, Raltegravir.

# Anexo V

# Publicaciones

## PUBLICACIONES SURGIDAS DE ESTA TESIS

(incluidas al final de este anexo)

- **Rubio-Garrido M.**, Ndarabu A., Reina G., Barquín D., Fernández-Alonso M., Carlos S., Holguín A. Utility Of POC Xpert HIV-1 Tests For Detection-Quantification Of Complex HIV Recombinants Using Dried Blood Spots From Kinshasa, D. R. Congo. *Scientific Reports* 9, 5679 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41963-y>. Factor de impacto: 4,122 (Q1).
- **Rubio-Garrido M.**, González-Alba J.M., Reina G., Ndarabu A., Barquín D., Carlos S., Galán J.C., Holguín A. Current and historic HIV-1 molecular epidemiology in paediatric and adult population from Kinshasa in the Democratic Republic of Congo. *Scientific Reports* 10, 18461 (2020). <https://www.nature.com/articles/s41598-020-74558-z>. Factor de impacto: 4,122 (Q1).
- **Rubio-Garrido M.**, Reina G., Ndarabu A., Rodríguez-Galet A., Valadés-Alcaraz A., Barquín D., Carlos S., Holguín A. High drug resistance levels compromise the control of HIV in paediatric and adolescent population in Kinshasa, the Democratic Republic of Congo. *Plos One* (2021). Aceptado en revisión. Factor de impacto: 2.766 (Q1).
- **Rubio-Garrido M.**, Avendaño-Ortiz J., Ndarabu A., Rubio C., Reina G., López-Collazo E., Holguín A. Effect of HIV exposure and infection on immune profile: a pilot study on a paediatric population. *Medicine*. En revisión.
- Rodríguez-Galet A., Valadés-Alcaraz A., **Rubio-Garrido M.**, Rodríguez-Domínguez M., Galán J.C., Reina G., Ndarabu A., Holguín A. Dried blood use for vaccine-preventable disease IgG detection in limited resource settings. *Pediatrics*. En revisión.
- Rodríguez-Galet A., **Rubio-Garrido M.**, Valadés-Alcaraz A., Reina G., Ndarabu A., Barquín D., Carlos S., Holguín A. Prevalence of protective IgG antibodies against six vaccineable pathogens in children and adolescents from Kinshasa, in the Democratic Republic of Congo using plasma and DBS. En escritura.

## OTRAS PUBLICACIONES

- Avendaño-Ortiz J., **Rubio-Garrido M.**, Lozano-Rodríguez R., del Romero J., Rodríguez C., Moreno S., Aguirre L.A., Holguín A., López-Collazo E. Soluble PD-L1: a potential immune marker for HIV-1 infection and virological failure. *Medicine* 99(20):e20065 (2020). <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000020065>. Factor de impacto: 2.028 (Q2).

- Beltrán-Pavez C., Gutiérrez-López M., **Rubio-Garrido M.**, Prieto L., Ramos J.T., Jimenez De Ory S., Navarro M., Diez-Romero C., Pulido F., Valadés-Alcaraz A., Valencia E., Holguín A on behalf of the Madrid Cohort of HIV-Infected Children integrated in the Pediatric Branch of the Spanish National AIDS Network (CoRISpe). Virological Outcome among HIV infected Patients Transferred from Pediatric Care to Adult Units in Madrid, Spain (1997-2017). *Scientific Reports* 10(1):16891 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70861-x>. Factor de impacto: 4,122 (Q1).
- Carrasco T., Barquín D., Ndarabu A., Fernández-Alonso M., **Rubio-Garrido M.**, Carlos S., Holguín A., Reina G. HCV diagnosis and sequencing using dried blood spots from patients in Kinshasa (DRC). A tool to achieve WHO 2030 targets. *Diagnostics* (2021). En revisión.
- Barquín D., Ndarabu A., Carlos S., Fernández-Alonso M., **Rubio-Garrido M.**, Makonda B., Holguín A., Reina G. HIV diagnosis using dried blood spots from patients in Kinshasa (DRC): a tool to detect HIV misdiagnosis and achieve WHO 2030 targets. *Diagnostics* (2021). En revisión.

# SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

## Utility Of POC Xpert HIV-1 Tests For Detection-Quantification Of Complex HIV Recombinants Using Dried Blood Spots From Kinshasa, D. R. Congo

Marina Rubio-Garrido<sup>1</sup>, Adolphe Ndarabu<sup>2</sup>, Gabriel Reina<sup>3</sup>, David Barquín<sup>3</sup>, Mirian Fernández-Alonso<sup>3</sup>, Silvia Carlos<sup>4</sup> & África Holguín<sup>1</sup>

Point-of-Care (POC) molecular assays improve HIV infant diagnosis and viral load (VL) quantification in resource-limited settings. We evaluated POC performance in Kinshasa (Democratic Republic of Congo), with high diversity of HIV-1 recombinants. In 2016, 160 dried blood samples (DBS) were collected from 85 children (60 HIV−, 18 HIV+, 7 HIV-exposed) and 75 HIV+ adults (65 treated, 10 naïve) at Monkole Hospital (Kinshasa). We compared viraemia with Cepheid-POC-Xpert-HIV-1VL and the non-POC-COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1-Testv2 in all HIV+, carrying 72.4%/7.2% HIV-1 unique/complex recombinant forms (URF/CRF). HIV-1 infection was confirmed in 14 HIV+ children by Cepheid-POC-Xpert-HIV-1Qual and in 70 HIV+ adults by both Xpert-VL and Roche-VL, identifying 8 false HIV+ diagnosis performed in DRC (4 adults, 4 children). HIV-1 was detected in 95.2% and 97.6% of 84 HIV+ samples by Xpert-VL and Roche-VL, respectively. Most (92.9%) HIV+ children presented detectable viraemia by both VL assays and 74.3% or 72.8% of 70 HIV+ adults by Xpert or Roche, respectively. Both VL assays presented high correlation ( $R^2 = 0.89$ ), but showing clinical relevant  $\geq 0.5$  logVL differences in 15.4% of 78 cases with VL within quantification range by both assays. This is the first study confirming the utility of Xpert HIV-1 tests for detection-quantification of complex recombinants currently circulating in Kinshasa.

The access to routine molecular tools for early infant HIV-1 diagnosis (EID) and viral load (VL) quantification in children and adults is required for an early antiretroviral treatment failure identification and the prompt linkage to care. It can reduce HIV-associated mortality and morbidity in infected populations<sup>1–3</sup>. However, most of 37 million HIV-infected individuals live in resource-limited countries with a high number of different circulating HIV-1 variants, high rates of infection and no or limited access to routine HIV monitoring<sup>4,5</sup>. These settings have insufficient access to laboratory facilities, cold-chain management shortcomings, and difficulties for plasma collection and sample transportation<sup>5,6</sup>.

Until now, conventional molecular tests for EID and VL needed long procedures conducted in specialized and centralized laboratory settings requiring substantial infrastructure and training, needing turnaround times of several weeks or months<sup>7,8</sup>. This could increase the risk of loss to clinical follow-up of patients, thus having a negative impact in the HIV treatment cascade<sup>9,10</sup>.

To improve the linkage to care of HIV-exposed and infected subjects, some new easy to perform molecular assays for EID and VL quantification have been developed: point-of-care or POC assays. They have emerged as

<sup>1</sup>HIV-1 Molecular Epidemiology Laboratory, Microbiology and Parasitology Department, University Hospital Ramón y Cajal-IRYCIS and CIBEResp-RITIP, Madrid, 28034, Spain. <sup>2</sup>Monkole Hospital, Kinshasa, Democratic Republic of the Congo. <sup>3</sup>Microbiology Department, Clínica Universidad de Navarra, Navarra Institute for Health Research (IdiSNA), Institute of Tropical Health, Universidad de Navarra (ISTUN), Pamplona, 31008, Spain. <sup>4</sup>Department of Preventive Medicine and Public Health, Institute of Culture and Society (ICS), Institute of Tropical Health (ISTUN), Universidad de Navarra, Navarra Institute for Health Research (IdiSNA), Pamplona, 31008, Spain. Correspondence and requests for materials should be addressed to G.R. (email: [gabi@unav.es](mailto:gabi@unav.es))



potential game-changers for improving EID and antiretroviral therapy (ART) monitoring programs<sup>11</sup> since they are simpler, faster (less than 2 hours), automated platforms that do not require as much infrastructure as the conventional lab-based systems<sup>8,12</sup>. They can be performed directly in health centers and not only in reference laboratories, which favors their use at or near the point-of-care, allowing HIV confirmation, ART initiation, or treatment or adherence interventions quickly after sampling (within about 2 hours). WHO promotes POC use for HIV diagnosis and monitoring in limited-resource settings<sup>13</sup>, as well as the use of dried blood spots (DBS) instead of plasma as being easier to collect and ship to centralized facilities than plasma<sup>14,15</sup>. However, most POC HIV assays have not yet been evaluated using well-characterized DBS panels.

HIV genetic variability can affect the success of HIV-1 detection and quantification by molecular assays<sup>16–23</sup>. However, the performance of most POC and non-POC assays has not been extensively evaluated testing all HIV-1 subtypes and complex recombinants present in countries with high genetic diversity and high rate of HIV infections. This is the case of Kinshasa (Democratic Republic of Congo, DRC), the epicenter of HIV-1 group M epidemic<sup>24</sup>, where a large number of HIV-1 recombinants are expected<sup>24–32</sup>. Thus, this study analyzes the efficacy of two POC techniques for EID and VL (Cepheid Xpert HIV-1 Qual and Xpert HIV-1 VL) *versus* the non-POC Roche CAP/CTM Quantitative VL test v2.0 in the same DBS panel collected from children and adults in Kinshasa, where a large diversity of HIV-1 variants co-circulate.

## Material and Methods

From April to November 2016, 160 DBS were collected at Monkole Hospital (Kinshasa, DRC) from 85 children (60 HIV-non infected, 18 HIV-positive, 7 HIV-exposed) and 75 HIV-infected adults (65 treated with clinical suspicion of treatment failure, 10 naive). DBS samples were prepared by spotting 70 µl of venous blood with micropipette, collected by venipuncture in EDTA-anticoagulant tubes into each dot on a Whatman 903 Protein Saver Card (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany). Two or three DBS cards were collected per patient. They were dried separately on a drying-rack overnight at room temperature in Monkole Hospital, sealed in a zip-lock plastic bag with desiccant bags and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until transported in dry ice to the laboratories in Madrid and Pamplona, Spain, where children and adult samples, respectively, were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further use.

**HIV diagnosis and viraemia quantification.** HIV diagnosis was firstly performed in DRC using rapid serological tests: Determine™ HIV-1/2 Ag/Ab (Alere), Double-Check Gold HIV 1&2 (Organics) and Uni-Gold HIV (Trinity Biotech) from 18-months old and by Biomerieux 4th generation immunoassay VIDAS® HIV Duo Ultra or exceptionally by molecular Abbott real-time HIV-1 Qualitative in infants under 18-months old. In Madrid, Spain, HIV serological status in the 85 children was confirmed with BioRad Geenius™ HIV-1/2 confirmatory assay using one DBS dot per patient, as previously reported<sup>33</sup>. All HIV seropositive and undetermined pediatric DBS by Geenius were then tested by POC Cepheid Xpert Qual (Xpert Qual), which provides a binary “detected”/“not detected” result<sup>34</sup>. In Navarra, Spain, HIV serostatus was confirmed in all adults by two 4th generation immunoassays: Elecsys® HIV combi PT (Roche) and VIDAS® HIV Duo Quick (bioMérieux).

HIV-1 viremia was quantified using Cepheid Xpert HIV-1 VL (Xpert VL)<sup>35</sup> and COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test v2.0 (Roche VL)<sup>36</sup> in all HIV+ DBS, both techniques based on real time amplification of HIV genome. All assays were performed using one dot eluted in Xpert Qualitative buffer for Xpert assays or Roche SPEX buffer for Roche-VL as lysis buffer to elute the DBS dots, according to manufacturer's instructions. GeneXpert® Instrument automates and integrates specimen preparation, HIV-1 total nucleic acids (viral RNA and proviral DNA) extraction and amplification, and detection of the target sequence in specimens using real-time reverse transcriptase PCR (RT-PCR). The systems require the use of single-use disposable GeneXpert® cartridges that hold all the necessary RT-PCR reagents and host the RT-PCR processes.

For statistical analysis of VL data, any viraemia values reported by the system as  $<40$  cp/ml (by Xpert VL) or  $<20$  cp/ml (by Roche VL), lower limit of detection of each assay, were reported as 39 cp/ml or 19 cp/ml, respectively, being considered detected but not quantifiable. We identified treated subjects under therapeutic failure when they present HIV-1 viraemias of 1,000 cp/ml or higher, clinical treatment failure threshold using DBS<sup>37</sup>. Both HIV-1 VL assays were based on real time PCR, providing an assay-specific cycle threshold (Ct), which inversely correlates with the starting concentration of the viral genome in the infected specimen. Ct values were recorded following DBS VL quantification by both Xpert VL and Roche VL platforms using one DBS dot in each sample.

We provided the number of HIV-1 RNA copies per dot and per plasma milliliter after considering patient's hematocrit assuming 39% hematocrit for children, 42% for women and 47% for men, according to previous studies<sup>38,39</sup>. This lead to plasma volumes of 42.7 µl, 40.6 µl and 37.1 µl, respectively, in 70 µl blood collected per dot. The main features of the three molecular HIV assays used in the study are described in Table 1.

**HIV-1 variant characterization.** For HIV-1 variant characterization, RNA was extracted from 2 DBS dots using the NucliSENS easyMAG automated platform (BioMérieux) or manual High-Pure Viral Nucleic Acid (Roche) kit. Viral RNA was amplified in the HIV-1 *pol* coding region by RT-PCR and nested-PCR using primers designed by WHO<sup>40</sup> as previously described<sup>41</sup> and/or ANRS<sup>42</sup>. Viral sequences included the complete HIV-1 *pro*-tease (*PR*, codons 1–99), and partial retrotranscriptase (*RT*, codons 1–335/440) and integrase (*IN*, codons 1–285). PCR amplicons were purified using the Illustra™ ExoProStar 1-Step™ (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK) and sequenced by Macrogen Inc. (Gasan-dong, Geumchun-gu, Seoul, Korea). HIV-1 variant was characterized by phylogenetic analysis (phy) using MEGA6 with Tamura 3-parameters as the evolutionary model with 1,000 bootstrap resampling. The bootstrap cut-off was set at 70. The tree topology was obtained using Neighbor Joining method. At least two representative HIV-1 sequences of each HIV-1 non-M group (O, P, N), and from each group M variant (9 subtypes, 6 sub-subtypes and 83 CRF available at the moment of the analysis



	Qualitative assays (for HIV-1 diagnosis)	Quantitative assays (for HIV-1 viral load quantification)	
	Xpert Qual	Roche VL	Xpert VL
Company	Cepheid	Roche	Cepheid
POC molecular assay	Yes	No	Yes
Viral targets	3'end-5'UTR	Gag + LTR	3'end-5'UTR
Sample (according to technical report)	Whole blood (100 µl) DBS (1 dot)	Plasma	Plasma (1 ml)
LOD	203 cp/ml (VQA, whole blood) 278 cp/ml (WHO, whole blood) 531 cp/ml (VQA in DBS) 668 cp/ml (WHO in DBS)	20 cp/ml (plasma)	15.3 cp/ml (VCA in plasma) 18.3 cp/ml (WHO in plasma)
LOQ	—	20 cp/ml (plasma) 20 cp/dot (DBS)*	40 cp/ml (plasma) 40 cp/dot (DBS)
Approved for EID using plasma	No	No	No
Approved for EID using DBS or whole blood	Yes	No	No
Approved for VL using plasma	—	Yes	Yes
Approved for VL using DBS	—	No	No
Detected HIV-1 groups	M, N and O	M and O	M, N and O

**Table 1.** Characteristics of molecular assays for HIV-1 diagnosis and VL quantification. VL, viral load; EID, early infant HIV-1 diagnosis; POC, point of care; LOD/Q, limit of detection/quantification; DBS, Dried Blood Spots; HIV-1-RNA cp/ml, cp/ml plasma; LTR, long terminal repeats; UTR, untranslated region within viral LTR; Roche VL, COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test v2.0; Xpert Qual, Cepheid Xpert HIV-1 Qual; Xpert VL, Cepheid Xpert HIV-1 VL; VQA: HIV-1 subtype B from viral quality assurance laboratory; WHO: HIV-1 subtype B from WHO 3<sup>rd</sup> International Standard NIBSC code 10/152 <http://www.nibsc.org/documents/ifu/10-152.pdf>. Data according to technical reports. LOD Xpert HIV-1 VL and Xpert HIV-1 Qual available<sup>61,76</sup>. \*Data reported by this study.

among the 98 described<sup>43</sup> were taken as references. Sequences not identified as any known non-M group, group M subtype or CRF by phy were considered HIV-1 group M unique recombinant forms (URF) in *pol* (URF<sub>pol</sub>).

**Accession numbers.** PR, RT and/or IN HIV-1 sequences were submitted to GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)) with the following accession numbers: MH920378–MH920435.

**Statistical analysis.** Correlation analysis was performed using the Spearman rank test and linear regression. We calculated the intraclass correlation coefficient (ICC). To determine differences between two viral load assays, the Bland-Altman plot method<sup>44</sup> was used. The clinically relevant difference between two VL measurements was considered at 0.5 log<sub>10</sub> cp/ml, as described previously<sup>45–47</sup>. For all analysis, 95% confidence intervals were considered. All statistical analyses were performed using Excel, STATA v11 and GraphPad Prism 6.

**Ethical aspects.** The project was approved by the Human Subjects Review Committees at Monkole Hospital/University of Kinshasa (Kinshasa, DRC), University Hospital Ramón y Cajal (Madrid, Spain) and University of Navarra (Pamplona, Spain). Informed consent of enrolled adults and of parents or guardians of enrolled children was obtained. All methods were carried out in accordance with relevant guidelines and regulations.

## Results

**High percentage of false positive diagnosis by rapid serological testing in DRC and delay in infant HIV diagnosis.** We evaluated the HIV-1 quantification efficacy of different molecular assays (POC and non-POC) in dried blood carrying different HIV-1 non-B subtypes and complex recombinants, mainly URF. For that purpose, DBS were collected from 85 children (60 HIV-uninfected, 18 HIV-infected, and 7 HIV-exposed) and 75 HIV-infected adults from Kinshasa (DRC) during 2016. The main characteristics of the study subjects are recorded in Table 2. The 160 study subjects were mainly seropositive by rapid serological tests in DRC (58.75%), female (57.5%) and antiretroviral experienced (46.2%). The mean age for HIV diagnosis in DRC was 8.1 (SD 5.38) years old in children and 40.4 (SD 12.13) in adults. The mean age at DBS collection was 9.8 (SD 5.11) years old in children and 46.5 (SD 12.27) in adults. All but one children were born in Kinshasa, 8.2% were orphaned and 6 presented HIV/ *Mycobacterium tuberculosis* confection. Most adults were female (70.7%)

Among the 92 children and adults diagnosed as HIV positive in the local laboratory in Congo by rapid tests and 80.4% were antiretroviral (ARV) experienced at sampling. The remaining were ART-naïve or with unknown treatment data. NRTI and NNRTI were the most used ARVs in the study cohort, Zidovudine + Lamivudine + Nevirapine being prescribed in 60 treated patients (13 children and 47 adults), mainly as first line therapy (50 cases). Only 8 patients received protease inhibitors (PIs) based treatment with Lopinavir/Ritonavir, while integrase inhibitor use was absent among study subjects. (Table 2).

HIV-1 infection was confirmed in 16.5% of 85 children by Xpert Qual and in 93.3% of 75 HIV+ adults diagnosed in DRC by both Xpert VL and Roche VL. However, we identified false positive HIV diagnosis in DRC after following rapid serology testing algorithm in 4 adults (range 23.8–28.5 years age) and in 4 children (range 5.3–13.1 years age), and 5 of them (2 adults, 3 children) were under unnecessary ART for a mean time of 3.9 years (Table 3). Xpert Qual confirmed the absence of HIV-1 infection in 4 DBS from children erroneously diagnosed as HIV positive in the DRC, as in other 8 HIV negative cases providing undetermined HIV status by Geenius

	Children	Adults	Total (%)
Number	85 (100%)	75 (100%)	160 (100%)
Gender (male)	46 (54.1%)	22 (29.3%)	68 (42.5%)
<b>Mean age</b>			
At DBS collection (range)	9.8 (0–18)	46.5 (24.8–73)	26.5 (0–73)
At HIV diagnosis at DRC (range)	8.1 (0–16)	40.4 (0–65.3)	33.7 (0–65.3)
<b>HIV positive status</b>			
By rapid testing in DRC	18 (21.2%)	74 (98.7%)	92 (57.5%)
by molecular testing and serology in Spain	14 (16.5%)	70 (93.3%)	84 (52.5%)
False positive HIV diagnosis in DRC	4 (4.7%)	4 (5.3%)	8 (5%)
<b>ART exposure among 92 HIV+ diagnosed in DRC</b>			
ART naïve	2	10	13
ART	16*	58*	74
Unknown	0	7	5
<b>ART exposure among 84 with confirmed diagnosis in Spain</b>			
ART naïve	1	9	10
ART	13	56	69
Unknown	0	5	5
<b>HIV-1 viraemia among 69 confirmed HIV+ under ART in DRC</b>			
Not detected only by Roche VL	0	1	1
Not detected only by Xpert VL	0	4	4
Not detected by both Roche and Xpert VL	3	5	8
>1,000 cp/dot by Xpert VL	3	12	15
>1,000 cp/ml by Xpert VL*	12	52	64
>1,000 cp/dot by Roche VL	6	12	18
>1,000 cp/ml by Roche VL*	12	32	44
<b>Number of different ART regimens among 69 treated in DRC</b>			
1	10 (76.9%)	34 (60.7%)	44 (63.8%)
2	2 (15.4%)	14 (25%)	16 (23.2%)
3	0	7 (12.5%)	7 (10.1%)
4	1 (7.7%)	1 (1.8%)	2 (2.9%)
<b>NRTI experienced</b>			
3TC	13	58	71
AZT	10	46	56
TDF	5	27	32
DDI	0	3	3
ABC	0	4	4
<b>NNRTI experience</b>			
NVP	10	43	53
EFV	6	29	35
<b>PI experience</b>			
LPV/r	1	7	8
HIV+ subjects with available pol HIV-1 sequences	13 (92.8%)	45 (64.3%)	58/(69%)
<b>HIV-1 variant by phy</b>			
Non-B subtypes	2/13 (15.4%)	4/45 (8.9%)	6 (10.3%)
CRF	2/13 (15.4%)	8/45 (17.8%)	10 (17.3%)
URF	9/13 (69.2%)	33/45 (73.3%)	42 (72.4%)

**Table 2.** Characteristics of study population from Kinshasa (DRC) with collected DBS in 2016. DRC, Democratic Republic of Congo; DBS, dried blood Spot; ART, antiretroviral treatment; NTRI, nucleoside transcriptase reverse inhibitor; NNRTI, non-NRTI; PI, Protease inhibitor; 3TC, Lamivudine; AZT, Zidovudine; TDF, Tenofovir; DDI, Didanosine; ABC, Abacavir; NVP, Nevirapine; EFV, Efavirez; LPV/r, Lopinavir/Ritonavir; Phy, phylogenetic analysis; CRF, circulating recombinant form; URF, unique recombinant form. \*Corrected cp/ml plasma considering hematocrit. Among 74 treated subjects in DRC, 3 were false positive children and 2 false positive adults.

BioRad. The 4 false positive in adults provided negative results by two VL assays (Roche and Xpert), three of them provided negative result by two 4<sup>th</sup> generation immunoassays (Roche Elecsys® *HIV combi PT* and bioMérieux *VIDAS® HIV Duo Quick*), and the remaining case only by VIDAS assay. Thus, the rate of false positive HIV diagnosis among pediatric HIV-exposed population was 22.2% (4/18) and 5.3% (4/75) for HIV-infected adults.



**Successful detection of HIV-1 variants in Kinshasa by Xpert VL and Roche VL.** Among the 84 HIV+ total samples selected after excluding those 8 DBS samples determined to be false positives, 95.2% could be detected by Xpert VL and 97.6% by Roche VL, the remaining being undetected (Table 4). Among those specimens with detectable HIV RNA, Xpert VL vs. Roche VL could quantify and provide HIV-1 viraemia values ( $\geq 40$  vs.  $\geq 20$  cp/dot or  $\geq 936$ –1078 vs.  $\geq 468$ –539 cp/ml plasma depending on hematocrit) for 65 (77.4%) vs. 66 (78.6%) DBS samples, respectively. Most (92.9%) of 14 HIV+ children presented quantifiable viraemia by both Xpert-VL ( $\geq 40$  cp/dot) and Roche-VL ( $\geq 20$  cp/dot) assays and 74.3% or 72.8% of 70 HIV+ adults by Xpert or Roche, respectively. Two specimens not detected by Roche were detected by Xpert ( $< 40$  cp/ml), while 4 specimens below limit of detection of Xpert could be only detected by Roche, with lower detection limit ( $< 20$  cp/ml) (Table 4).

**High correlation among Xpert and Roche VL assays using DBS.** Viral Load results within the quantification range of both assays were available for 78 (92.8%) of 84 HIV+ patients. The POC Cepheid Xpert HIV-1 VL assay showed excellent agreement (ICC = 1) with Roche VL for HIV-RNA quantification. A high and significant correlation was observed among both VL assays ( $R^2 = 0.89$ ,  $P < 0.001$ ), as shows the estimated regression line (Fig. 1). However, Ct values for HIV-1 quantification were VL assay dependent when quantifying the 78 DBS detected by both VL assays.

Xpert VL provided higher mean Ct ( $34.75 \pm 7.7$ , range 23.6–42.6) than Roche VL ( $29.4 \pm 3.77$ , range 20.3–36.6) in the panel, resulting in a mean Xpert VL of  $4.22 \log_{10}$  cp/ml  $\pm$  SD 1.06 ( $2.76 \log_{10}$  cp/dot  $\pm$  SD 1.16) and mean Roche VL of  $4.04 \log_{10}$  cp/ml  $\pm$  SD 1.12 ( $2.57 \log_{10}$  cp/dot  $\pm$  SD 1.12).

The similarities between both VL assays were evaluated by the Bland-Altman plot method (Fig. 2). HIV-1 VL overestimation by one of the two assays (Xpert VL or Roche VL) was observed in all but one specimen among the 78 DBS, although the difference was below a clinically relevant threshold of  $0.5 \log_{10}$  cp/ml in most cases (84.6%). The POC Xpert HIV-1 VL assay tended to overestimate HIV-1 VL in 69.2% samples, and the non-POC Roche VL in 29.5% specimens (Fig. 3, Table 4). The overall mean difference in the HIV-1 RNA values obtained by Xpert VL assay and Roche VL was  $0.30 \log_{10}$  cp/dot (95% CI: 0.26 to  $0.35 \log_{10}$  cp/dot) ( $P < 0.001$ ). However, clinical relevant differences ( $\geq 0.5 \log_{10}$  VL) ranging from  $-0.55$  to  $1.07$  were observed in 12 (15.4%) of 78 DBS specimens with VL above detection limit by both assays (Figs 2 and 3), differing across samples and assays. Eleven cases corresponded to Xpert VL use, while only one to Roche VL testing (Table 4).

**High percentage of complex recombinants in DRC and impact in VL quantification.** HIV-1 *pol* sequence was recovered from 58 of 84 HIV-1 + individuals (13 children and 45 adults) and studied by phylogeny. Among all 58 viral sequences obtained, we identified 6 (10.4%) non-B subtypes (2C, 3H, 1J), ten (17.2%) CRF (1 CRF05\_DF, 1 CRF11\_cpx, 1 CRF18\_cpx, 1 CRF19\_cpx, 1 CRF25\_cpx, 2 CRF27\_cpx, 3 CRF45\_cpx) and 42 (72.4%) URF. Thus, most (89.6%) of 58 obtained HIV-1 sequences were URF or CRF recombinants (Table 2). Neither HIV-2 nor non-M group infections were found in our study population. Both VL tests were able to detect and quantify all variants, including CRF and URF recombinants of the study cohort (Table 4).

The impact of each complex recombinant on VL quantification was unclear (Table 4, Supplementary Table 1, and Fig. 3). Among 42 URF detected, 61.9% provided higher VL by Xpert VL and 35.7% by Roche VL. Among 10 samples ascribed to 7 different CRF, 70% showed higher viraemia by Xpert VL and 30% by Roche VL. Subtypes C and H displayed higher viraemia values by Xpert VL and subtype J by Roche VL.

## Discussion

POC test use can improve the clinical management of HIV-infected infants and adults and reduce the delay in diagnosis and in ART failure identification<sup>14</sup>. Early infant diagnosis is a WHO priority<sup>14,48</sup>, since it allows early ART to be established and reduces irreversible damage to central nervous and immune systems, viral reservoirs, as well as HIV transmission and morbidity/mortality associated with HIV-1 infection<sup>49</sup>. A correct early HIV diagnosis is also essential, since false positive HIV tests might result in unnecessary antiretroviral treatment and psychological distress in falsely diagnosed individuals and families<sup>50</sup>. The use of DBS has been proposed as an alternative sample to plasma/serum, easier to be collected, stored and shipped, very convenient in limited resource countries<sup>15,33,37,51</sup>. The aim of this study was to evaluate the performance of two POC HIV-1 assays (Xpert-VL and Xpert Qual) for HIV detection and/or quantification using DBS in the DRC, a country with a high HIV-1 diversity including a high prevalence of complex recombinants, mainly URFs.

Although POC molecular testing prevents inappropriate HIV serological diagnosis and is cost-effective<sup>52</sup>, it is not yet globally adopted in all EID or adult programs<sup>48</sup>. In the DRC, the *National Program of fight against HIV-AIDS (PNLS)* recommends performing EID 0–2 days after birth, but POC assays for EID have not been implemented yet within the clinical routine of HIV-exposed infants.

We have evaluated the clinical impact of the lack of routine EID molecular testing in HIV-exposed newborns shortly after birth and of confirmatory serological testing in older children and adults in a cohort in Kinshasa. We have found false HIV diagnoses among 5% of the study participants that lead to unnecessary ART in five HIV uninfected subjects. The high prevalence of false positive diagnosis among HIV-exposed infants less than 18 years old could be explained by the long delay in PCR results from a centralized national laboratory, which were only available at the clinical center in Kinshasa 6 months after the original HIV serological test. Wrong diagnoses may also be a consequence of the absence of a confirmatory molecular test with a second new sample as recommended by WHO<sup>14</sup> for infants. In older children and adults, false HIV diagnosis can be due to the local absence of confirmatory serological analysis and the exclusive use of serological rapid testing for HIV diagnosis. Although rapid immunochromatographic test for HIV are recommended in low income countries<sup>53</sup>, the low HIV prevalence among the general population in the DRC (0.7%)<sup>4</sup> may be associated with a lower positive predictive value for these methods. In addition, rapid HIV testing is not appropriate for acute infection diagnosis<sup>53</sup>. Another aspect that could influence a misdiagnosis is the fact that a subjective reading of rapid HIV tests may speed up the

	ID/Spain	ARV experience at sampling	Time under ART (m)	Democratic Republic of the Congo					Spain							
				Determine	Uni-Gold	Double-Check	Definitive diagnosis	Age at diagnosis (y)	Elecsys Roche	Vidas Duo Quick	BioRad Geenius	Xpert Qual	Roche VL	Xpert VL	Definitive diagnosis	Age at diagnosis (y)
Children	P6	AZT + 3TC + NVP	96	Pos	Pos	Pos	Pos	unknown	—	—	Neg	Neg	—	—	HIV-	9.11
	P12	AZT + 3TC + NVP	21	Pos	Pos	Pos	Pos	0.55	—	—	Neg	Neg	—	—	HIV-	5.36
	P14	AZT + 3TC + NVP	22.4	Pos	Pos	Pos	Pos	3.57	—	—	Ind	Neg	—	—	HIV-	8.64
	N18	Naive	0	Pos	Pos	Pos	Pos	6.77	—	—	Ind	Neg	—	—	HIV-	13.17
Adults	CUN84	AZT + 3TC + NVP	176.4	Pos	Pos	—	Pos	unknown	Pos	Neg	Neg	—	Neg	Neg	HIV-	24.7
	CUN33	Naive	0	Pos	Pos	—	Pos	0 (birth)	Neg	Neg	Neg	—	Neg	Neg	HIV-	28.7
	CUN41	AZT + 3TC + EFV	87	Pos	Pos	—	Pos	28.5	Neg	Neg	Neg	—	Neg	Neg	HIV-	unknown
	CUN109	Naive	0	Pos	Pos	—	Pos	51	Neg	Neg	Neg	—	Neg	Neg	HIV-	29.07

**Table 3.** Eight false HIV diagnosis in DRC using rapid serological testing. HIV testing in DRC: Determine, rapid test Determine™ HIV-1/2 Ag/Ab (Alere); Uni-Gold, Uni-Gold HIV (Trinity Biotech) and Double-Check, Double-Check Gold HIV 1&2 (Organics). HIV testing in Spain: Elecsys Roche, 4<sup>th</sup> gen immunoassay Elecsys® HIV combi PT (Roche); VIDAS DUO Quick, 4<sup>th</sup> gen immunoassay VIDAS® HIV Duo Quick (bioMérieux); BioRad Geenius™ HIV-1/2; Xpert Qual, Cepheid Xpert Qual; Xpert VL, Cepheid Xpert HIV-1 VL; Roche VL, COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test v2.0. ARV, antiretroviral drugs; AZT, Zidovudine; 3TC, Lamivudine; NVP, Nevirapine; EFV, Efavirenz; m, months; y, years; VL, viral load; dash, not done; Ind, indeterminate; Neg, HIV negative; Pos, HIV positive.

			Xpert VL (POC assay)					
			Not detected	Detected not quantified <40 cp/dot	Quantified ≥40 cp/dot			No. DBS
					40–1,000 cp/dot	>1,000 cp/dot	Ct mean [range]	
Roche VL (Non-POC assay)	Not detected		—	2	0	0	0	2
	Detected not quantified <20 cp/dot		4	9	3	0	34.1 [30.1–36.6]	16
	Quantified (≥20 cp/dot)	≥20–39 cp/dot	0	3	7	0	32.5 [31.8–34.2]	10
		40–1,000 cp/dot	0	1	25	2	30.3 [28.2–32.8]	28
		>1,000 cp/dot	0	0	3	25	25.2 [20.3–27.4]	28
		Ct mean [range]	0	39.6 [33.2–42.6]	36.3 [33.9–41.8]	30.2 [23.6–33.6]	—	—
	No. DBS		4	15	38	27	—	84
Available <i>pol</i> HIV-1 sequences			nd	4 (26.7%)	27 (71%)	27 (100%)		58 (69%)
Carrying complex recombinants (CRF + URF)			nd	4	23	25	—	52
Carrying non-B variants			nd	0	4	2	—	6

**Table 4.** HIV-1 VL quantification in 84 HIV-1+ DBS (14 HIV+ children and 70 HIV+ adults) using two molecular assays. No., number; VL, HIV-1 viral load POC, point of care; DBS, dried blood sample; cp/dot, HIV-1 RNA copies per DBS dot; nd, not available sequences due to low VL. Ct, VL assay-specific cycle threshold, which inversely correlates with the starting concentration of the viral genome in infected specimen.

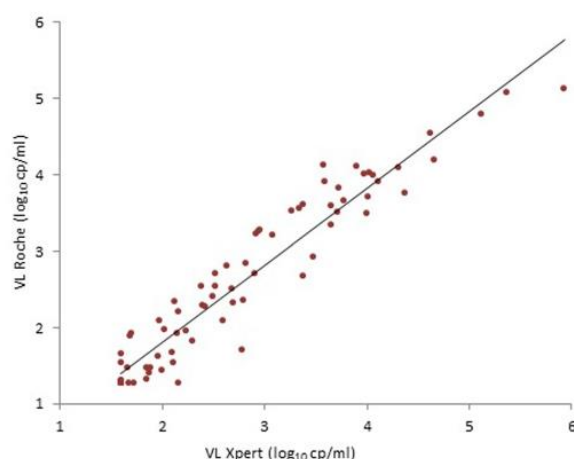
communication of false positive results. The high mean age at HIV diagnosis in DRC in children (8.1 years) from the study cohort would suggest HIV diagnosis delay, since most of them acquired HIV infection by vertical route according to clinical reports.

Results also show that Xpert and Roche molecular tests were superior to fourth generation serological screening assays to identify HIV infection in HIV-exposed children older than 18 months and adults. Moreover, Xpert resolved HIV status and rule out HIV infection in DBS from 10 individuals with undetermined results by Geenius confirmatory assay, in agreement with recent studies<sup>54</sup>. It could be due to the fact that Xpert HIV-1 Qual can detect HIV-1 infections up to 7–10 days before seroconversion, an average of nine days earlier than a panel of HIV-1 antibody tests and five days earlier than a panel of HIV-1 antigen p24 tests<sup>34</sup>. Xpert® HIV-1 Qual may play a role in the diagnosis of HIV, either in EID, as a confirmatory test after antibody-based testing, or for the detection of acute HIV infection in antibody negative patients recently infected<sup>55</sup>.

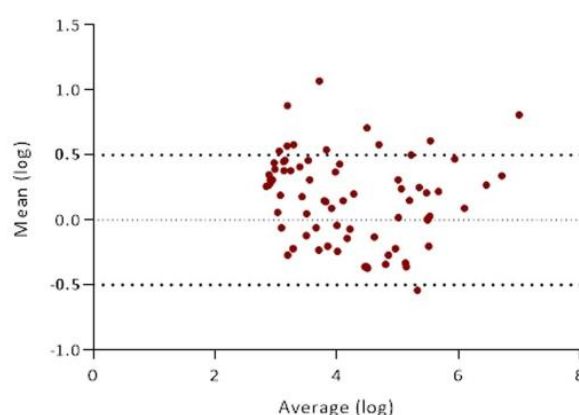
POC Xpert VL and non-POC VL Roche assays were also suitable in quantifying VL using DBS in the DRC. A high percentage of subjects under ART in the DRC showed VL levels above 1,000 cp/ml by Xpert (92.7%) or Roche (63.8%) (Table 1), the VL threshold defined by WHO to confirm virological failure in low- and middle-income countries and when using DBS in adults and children<sup>37</sup>. This is the optimal threshold for presenting the lowest percentage of misclassification compared with higher thresholds<sup>51</sup>. In fact, most patients in the study had a clinical suspicion of virological failure. However, the prevalence of ART failure was overestimated using Roche VL and this threshold, resulting less specific than other VL assays using DBS, as described in previous studies<sup>51,56</sup>.

Despite the good correlation in VL quantification using Xpert VL with the no-POC Roche VL assay ( $R^2 = 0.89$ ), still 15.4% of 78 samples with VL within the quantification range of both assays presented clinically significant VL differences above  $0.5 \log_{10}$  cp/ml, according to previous studies<sup>16,23,57</sup>. Thus, we recommend the





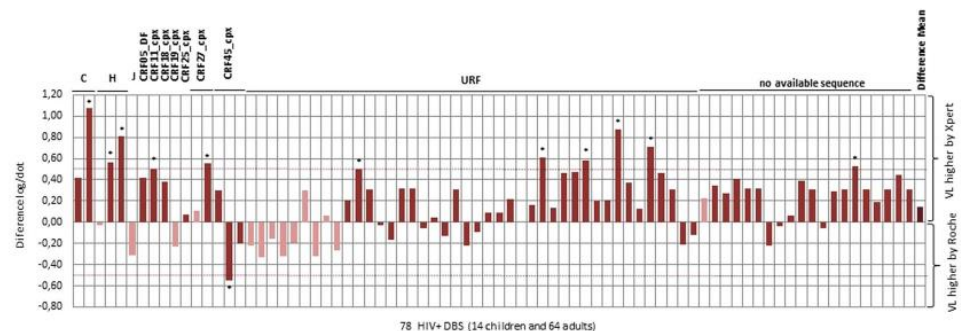
**Figure 1.** Correlation between Xpert VL and Roche VL assays in 78 HIV+ samples with quantified VL. Scatter plot with a simple linear regression analysis of 78 samples (14 children + 64 adults) which were quantified (VL of  $\geq 40$  or  $\geq 20$  cp/ml) by both assays. Graphic using log of direct VL from in one DBS dot (HIV-1 RNA copies per dot). VL, Viral load.



**Figure 2.** Bland-Altman analysis showing difference vs. average viral load comparing Xpert VL and Roche VL in 78 HIV+ quantified by both assays. HIV+ samples from 78 patients (14 children, 64 adults) quantified by both assays.

expanded use of VL in the DRC for an early detection of virological failure as well as the use of the same VL technique for each patient during ART monitoring to reduce potential assay-associated viraemia overestimations, which could be interpreted as virological failure events. This could reduce unnecessary ART regimen switches in these patients, favoring an early clinical response by reinforcing adherence or changing ART regimen if resistant variants are detected before clinical symptoms associated with treatment failure appear. The achievement of the 90-90-90 UNAIDS objectives depend on HIV monitoring, otherwise a future epidemic of HIV resistant strains may occur and delay these objectives in Sub-Saharan Africa<sup>58</sup>. The finding of assay dependent Ct values for HIV-1 quantification reinforces the risk of establishing a standard Ct cutoff as accurate threshold value to differentiate virological failures in subjects under ART.

The continuous evolution of HIV can hinder diagnosis and complicate clinical practice<sup>59</sup>. Thus, one of the main challenges for molecular diagnostic and VL assays is to detect and/or quantify different HIV-1 variants correctly. According to the manufacturer's information, the Xpert® HIV-1 Qual assay has been validated for specimens including groups N, O and M (9 subtypes and recombinants A/E, A/B and AG/GH)<sup>60</sup> and the Xpert VL for groups N, O and M (9 subtypes, CRF01\_AE, CRF02\_AG, and CRF03\_AB)<sup>61</sup>. However, most 98 HIV-1 CRF<sup>63</sup> and complex unique recombinant forms (URF) have not been validated yet. Roche VL was evaluated by analysis of HIV-1 group O and group M subtypes A through H from cell culture origin<sup>36,62</sup>, although it was also able to quantify a number of CRFs<sup>16</sup>. However, none of them has been evaluated across a large panel of URF variants, as we reported. We demonstrate that POC-Xpert assays and VL and Roche-VL can successfully detect and quantify complex recombinants in *pol*.



**Figure 3.** HIV-1 viraemia differences by Xpert VL vs. Roche VL in 78 HIV+ DBS quantified by both assays and HIV-1 variants in 58 samples with available sequence. Light color in pediatric samples. VL, viral load; 58 non-B variants infecting study population: 2C, 3H, 1J, 1CRF05\_DF, 1CRF11\_cpx, 1CRF18\_cpx, 1CRF19\_cpx, 1CRF25\_cpx, 2CRF27\_cpx, 3CRF45\_cpx. The absence of bar in one URF indicates the same VL values using both assays. CRF, circulating recombinant form; URF, unique recombinant form. \*Viral load differences >0.5 log.

We also provide new data related to the HIV molecular epidemiology in Kinshasa, reporting an extremely high rate of unique inter-subtype recombinants in recently infected populations, although URF prevalence could be underestimated since HIV-1 variants were characterized considering *pol* gene but not the complete genome. Other authors have also highlighted the extreme diversity of HIV strains circulating in the country with a high presence of URFs and different CRFs, together with a low presence of subtype C<sup>28,31</sup>.

Some studies have reported clinically-significant differences (>0.5 log) in VL quantification across techniques with the same non-B strains<sup>23,63–65</sup>. These results would suggest different rates of detection across assays due to genetic variability in the HIV-1 gene region targeted by the assays in incorrectly quantified samples, as previously demonstrated for a CRF02\_AG variant<sup>63</sup>. Previous evaluations supported the efficacy of Xpert technology for the detection and quantification of HIV-1 non-B variants<sup>64,66–68</sup>, highlighting Xpert utility in areas with a high genetic variability of HIV, such as Sub-Saharan Africa<sup>57,69–72</sup>.

POC Xpert technology for diagnosis of other diseases such as tuberculosis<sup>73</sup>, shigellosis<sup>74</sup> or Monkeypox virus<sup>75</sup> has already been used in the DRC. The National HIV/AIDS Program in the DRC plans to use the existing Xpert machines for HIV EID testing and VL monitoring in order to improve the clinical care of HIV-infected children and adults. Our results demonstrate that Xpert performance is adequate for testing HIV-1 variants currently circulating in the DRC. Thus, due to simplicity, rapid results and good performance, POC Xpert HIV-1 can be useful in the decentralization of EID and VL monitoring from specialized laboratories in the DRC to local hospitals and clinics within their routine clinical care. This will help to reach the ambitious 90-90-90 goals in the country. We also confirmed that DBS could be a suitable sample for Xpert use in the DRC, requiring a minimum volume of blood, favoring molecular testing in infants and low-weight children. In addition, DBS samples offer additional advantages, they are not considered biohazardous once dried and are not as time and temperature sensitive as plasma specimens<sup>37</sup>.

An important limitation of this study is that we did not compare DBS to plasma due to the lack of paired plasma/DBS specimens collected for each subject in the study population. Moreover, due to the design of the study and sample size, we could not determine the statistical power of possible performance differences across assays in each specific HIV-1 variant. Finally, we could not explore the effect of DBS lysis buffer in viraemia quantification, which could influence DBS VL results according to previous reports<sup>76</sup>. The main strength of our study is that it shows the first results confirming the utility of POC Xpert HIV-1 tests and Roche VL platform for early HIV-1 diagnosis and for VL quantification of complex recombinants (mainly URF) currently circulating in Kinshasa, the epicenter of HIV-1 group M epidemic and where a large number of complex recombinants cocirculate. To our knowledge, there are no previous studies that have included a large panel of different HIV-1 complex recombinants characterized by phylogenetic analysis during Xpert-POC HIV-1 evaluation for EID and VL. We also report some of the current limitations of HIV diagnosis and monitoring in DRC. Since Xpert assays and DBS use can improve early diagnosis in HIV-exposed infants and early detection of ART failures in countries with complex HIV-1 recombinants and limited infrastructures, as in the DRC, our results could have a direct clinical impact in global HIV diagnosis and monitoring to reach early the 90-90-90 objectives.

## References

- Newell, M. L. *et al.* Mortality of infected and uninfected infants born to HIV-infected mothers in Africa: a pooled analysis. *Lancet*. **364**, 1236–1243 (2004).
- Violari, A. *et al.* Early antiretroviral therapy and mortality among HIV-infected infants. *N Engl J Med*. **359**, 2233–2244 (2008).
- Hughes, M. D. *et al.* Monitoring plasma HIV-1 RNA levels in addition to CD4 lymphocyte count improves assessment of antiretroviral therapeutic response. ACTG 241 Protocol Virology Substudy Team. *Ann Intern Med*. **126**, 929–938 (1997).
- Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). UNAIDS data 2018, [http://www.unaids.org/sites/default/files/media\\_asset/20170720\\_Data\\_book\\_2017\\_en.pdf](http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/20170720_Data_book_2017_en.pdf) (2018).



5. Rutstein, S. E. *et al.* On the front line of HIV virological monitoring: barriers and facilitators from a provider perspective in resource-limited settings. *AIDS Care*. **28**, 1–10 (2016).
6. Bélec, L. & Bonn, J. P. Challenges in implementing HIV laboratory monitoring in resource-constrained settings: how to do more with less. *Future Microbiol.* **6**, 1251–1260 (2011).
7. Bourlet, T., Memmi, M., Saoudin, H. & Pozzetto, B. Molecular HIV screening. *Expert Rev Mol Diagn.* **13**, 693–705 (2013).
8. UNITAID, World Health Organization (WHO). HIV/AIDS Diagnostics Technology Landscape, [https://unitaid.eu/assets/UNITAID-HIV\\_Diagnostic\\_Landscape-4th\\_edition.pdf](https://unitaid.eu/assets/UNITAID-HIV_Diagnostic_Landscape-4th_edition.pdf) (2014).
9. Lecher, S. *et al.* Progress with scale-up of HIV Viral Load monitoring - seven Sub-Saharan African countries, January 2015–June 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* **64**, 1287–1290 (2016).
10. Roberts, T., Cohn, J., Bonner, K. & Hargreaves, S. Scale-up of routine viral load testing in resource-poor settings: current and future implementation challenges. *Clin Infect Dis.* **62**, 1043–1048 (2016).
11. Celletti, F., Sherman, G. & Mazanderani, A. H. Early infant diagnosis of HIV: review of current and innovative practices. *Curr Opin. HIV AIDS*. **12**, 112–116 (2017).
12. Engel, N. & Pie Pant, N. Qualitative research on point-of-care testing strategies and programs for HIV. *Expert Rev Mol Diagn.* **15**, 71–75 (2015).
13. Wu, G. & Zaman, M. Low-cost tools for diagnosing and monitoring HIV infection in low-resource settings. *Bull World Health Organ.* **90**, 914–920 (2012).
14. World Health Organization (WHO). WHO recommendations on the diagnosis of HIV infection in infants and children, <http://www.who.int/iris/handle/10665/44275> (2010).
15. De Mulder, M. & Holguin, A. Dried blood spots for monitoring HIV infection in Public Health Programs in developing countries. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **31**, 100–107 (2013).
16. Alvarez, P. *et al.* HIV-1 variability and viral load technique could lead to false positive HIV-1 detection and to erroneous viral quantification in infected specimens. *J Infect.* **71**, 368–376 (2015).
17. Alvarez, P. *et al.* Evaluation of four commercial virological assays for early infant HIV-1 diagnosis using dried blood specimens. *Pediatr Res.* **81**, 80–87 (2017).
18. Maritz, J., van Zyl, G. U. & Preiser, W. Irreproducible positive results on the Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 Qual test are different qualitatively from confirmed positive results. *J Med Virol.* **86**, 82–87 (2014).
19. Sutcliffe, C. G., Moss, W. J. & Thuma, E. P. False positive results in infancy and management of uninfected children receiving antiretroviral therapy. *Pediatr Infect Dis. J* **34**, 607–609 (2015).
20. Feucht, U. D., Forsyth, B. & Kruger, M. False-positive HIV DNA PCR testing of infants: implications in a changing epidemic. *S Afr Med J.* **102**, 149–152 (2012).
21. Kageha, S. *et al.* Discrepant test findings in early infant diagnosis of HIV in a national reference laboratory in Kenya: challenges and opportunities for programs. *J Trop Pediatr.* **58**, 247–252 (2012).
22. Avettand-Fénoël, V. *et al.* Comparative performance of the Biocentric Generic Viral Load, Roche CAP/CTM v1.5, Roche CAP/CTM v2.0 and m2000 Abbott assays for quantifying HIV-1 B and non-B strains: Underestimation of some CRF02 strains. *J Clin Virol.* **110**, 36–41 (2019).
23. Holguin, A., López, M., Molinero, M. & Soriano, V. Performance of three commercial viral load assays, Versant human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA bDNA v3.0, Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1, and NucliSens HIV-1 EasyQ v1.2, testing HIV-1 non-B subtypes and recombinant variants. *J Clin Microbiol.* **46**, 2918–2923 (2008).
24. Worobey, M. *et al.* Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960. *Nature.* **455**, 661–664 (2008).
25. Potts, K. E. *et al.* Genetic diversity of human immunodeficiency virus type 1 strains in Kinshasa, Zaire. *AIDS Res Hum Retroviruses.* **9**, 613–618 (1993).
26. Vidal, N. *et al.* Unprecedented degree of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M genetic diversity in the Democratic Republic of Congo suggests that the HIV-1 pandemic originated in Central Africa. *J Virol.* **74**, 10498–10507 (2000a).
27. Vidal, N., Mulanga-Kabeya, C., Nzilambi, N., Delaporte, E. & Peeters, M. Identification of a complex env subtype E HIV type 1 virus from the Democratic Republic of Congo, recombinant with A, G, H, J, K, and unknown subtypes. *AIDS Res Hum Retroviruses.* **16**, 2059–2064 (2000b).
28. Yang, C. *et al.* Genetic diversification and recombination of HIV type 1 group M in Kinshasa, Democratic Republic of Congo. *AIDS Res Hum Retroviruses.* **21**, 661–666 (2005).
29. Vidal, N., Mulanga-Kabeya, C., Nzilambi, N., Delaporte, E. & Peeters, M. Characterization of an old complex circulating recombinant form, CRF27\_cpx, originating from the Democratic Republic of Congo (DRC) and circulating in France. *AIDS Res Hum Retroviruses.* **24**, 315–321 (2008).
30. Vidal, N., Bazepeo, S. E., Mulanga, C., Delaporte, E. & Peeters, M. Genetic characterization of eight full-length HIV type 1 genomes from the Democratic Republic of Congo (DRC) reveal a new subtype, A5, in the A radiation that predominates in the recombinant structure of CRF26\_A5U. *AIDS Res Hum Retroviruses.* **25**, 823–832 (2009).
31. Djoko, C. F. *et al.* High HIV type 1 group M pol diversity and low rate of antiretroviral resistance mutations among the uniformed services in Kinshasa, Democratic Republic of the Congo. *AIDS Res Hum Retroviruses.* **27**, 323–329 (2011).
32. Ward, M. J., Lycett, S. J., Kalish, M. L., Rambaut, A. & Leigh Brown, A. J. Estimating the rate of intersubtype recombination in early HIV-1 group M strains. *J Virol.* **87**, 1967–1973 (2013).
33. McPhee-Fernández, C. *et al.* HIV-1 infection using dried blood spots can be confirmed by Bio-Rad Geenius™ HIV 1/2 confirmatory assay. *J Clin Virol.* **63**, 66–69 (2015).
34. Cepheid. Xpert® HIV-1 Qual, <http://www.cepheid.com/en/cepheid-solutions/clinical-ivd-tests/virology/xpert-hiv-1-qual> (2018).
35. Cepheid. Xpert® HIV-1 Viral Load, <http://www.cepheid.com/en/cepheid-solutions/clinical-ivd-tests/virology/xpert-hiv-1-viral-load> (2018).
36. Roche. COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test v2.0, [http://www.who.int/diagnostics\\_laboratory/evaluations/pq-list/hiv-vrl/160530\\_0147\\_046\\_00\\_public\\_report\\_v1\\_final.pdf](http://www.who.int/diagnostics_laboratory/evaluations/pq-list/hiv-vrl/160530_0147_046_00_public_report_v1_final.pdf) (2012).
37. World Health Organization (WHO). Technical and operational considerations for implementing HIV viral load testing, [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/128121/9789241507578\\_eng.pdf?sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/128121/9789241507578_eng.pdf?sequence=1) (2014).
38. Robins, E. B. & Blum, S. Hematologic Reference Values for African American Children and Adolescents. *Am J Hematol.* **82**, 611–614 (2007).
39. Food and Drug Administration (FDA). Blood Serum Chemistry: Normal Values, <https://www.fda.gov/downloads/ICECI/Inspections/IOM/UCM135835.pdf> (2015).
40. World Health Organization (WHO). WHO manual for HIV drug resistance testing using dried blood spot specimens, [http://www.who.int/hiv/topics/drugresistance/dbs\\_protocol.pdf](http://www.who.int/hiv/topics/drugresistance/dbs_protocol.pdf) (2010).
41. Holguin, A. *et al.* Transmitted drug-resistance in human immunodeficiency virus-infected adult population in El Salvador, Central America. *Clin Microbiol Infect.* **19**, 523–532 (2013).
42. France Recherche Nord & Sud SIDA-HIV Hépatites (ANRS) protocol. ANRS AC11 Resistance Study Group PCR and Sequencing Procedures: HIV-1, <http://www.hivfrenchresistance.org/anrs-procedures.pdf> (2015).
43. Los Alamos National Laboratory. Circulating Recombinant Forms (CRFs). HIV sequence database, <https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html> (2018).



44. Bland, J. M. & Altman, D. G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*. **1**, 307–310 (1986).
45. Saag, M. S. *et al.* HIV viral load markers in clinical practice. *Nat Med*. **2**, 625–629 (1996).
46. Department of Health and Human Services. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents, <http://www.aidsinfo.nih.gov/contentfiles/adultandadolescentGL.pdf> (2018).
47. Sollis, K. A. *et al.* Systematic review of the performance of HIV viral load technologies on plasma samples. *PloS One*. **18**(9), 85869, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085869> (2014).
48. Mallampati, D., Ford, N., Hannaford, A., Sugandhi, N. & Penazzato, M. Performance of virological testing for early infant diagnosis: A systematic review. *J Acquir Immune Defic Syndr*. **1**, 308–314 (2017).
49. Cohen, M. S. *et al.* Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy. *N Engl J Med*. **11**, 493–505 (2011).
50. Bhattacharya, R., Barton, S. & Catalan, J. When good news is bad news: psychological impact of false positive diagnosis of HIV. *AIDS Care*. **20**, 560–564 (2008).
51. Schmitz, M. E. *et al.* Field evaluation of Dried Blood Spots for HIV-1 Viral Load monitoring in adults and children receiving antiretroviral treatment in Kenya: Implications for scale-up in resource-limited settings. *J Acquir Immune Defic Syndr*. **74**, 399–406 (2017).
52. Dunning, L. *et al.* The value of confirmatory testing in early infant HIV diagnosis programmes in South Africa: A costeffectiveness analysis. *PloS One*. **14**(11), 1002446, <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002446> (2017).
53. Tan, W. S. *et al.* Sensitivity of HIV rapid tests compared with fourth-generation enzyme immunoassays or HIV RNA tests. *AIDS*. **30**, 1951–1960 (2018).
54. Rakovsky, A. *et al.* Diagnosis of HIV-1 infection: Performance of Xpert Qual and Geenius supplemental assays in fourth generation ELISA-reactive samples. *J Clin Virol*. **101**, 7–10 (2018).
55. Sanders, E. J. *et al.* Targeted screening of at-risk adults for acute HIV-1 infection in sub-Saharan Africa. *AIDS*. **29**, 221–230 (2015).
56. Sawadogo, S. *et al.* Limited utility of dried-blood and plasma spot-based screening for antiretroviral treatment failure with Cobas Ampliprep/TaqMan HIV-1 version 2.0. *J Clin Microbiol*. **52**, 3878–3883 (2014).
57. Ceffa, S. *et al.* Comparison of the Cepheid GeneXpert and Abbott M2000 HIV-1 realtime molecular assays for monitoring HIV-1 viral load and detecting HIV-1 infection. *J Virol Methods*. **229**, 35–39 (2016).
58. Guichet, E. *et al.* High viral load and multidrug resistance due to late switch to second-line regimens could be a major obstacle to reach the 90-90-90 UNAIDS Objectives in Sub-Saharan Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses*. **32**, 1159–1162 (2016).
59. De Oliveira, F. *et al.* Detection of numerous HIV-1/MO recombinants in France. *AIDS*. **32**, 1289–1299 (2018).
60. Cepheid. XPERT® HIV-1 QUAL datasheet, [http://www.cephheid.com/administrator/components/com\\_productcatalog/library-file/s/5263e4b1cad8733be904f496b070bdd0-82a91c538de2b0d71ac23e5594020052-Xpert-HIV-1-Qual-Datasheet-3041-02.pdf](http://www.cephheid.com/administrator/components/com_productcatalog/library-file/s/5263e4b1cad8733be904f496b070bdd0-82a91c538de2b0d71ac23e5594020052-Xpert-HIV-1-Qual-Datasheet-3041-02.pdf) (2018).
61. Cepheid. Xpert® HIV-1 Viral Load Supporting National Programs from High-Throughput Reference Labs to Near-Patient Testing, [http://www.cephheid.com/administrator/components/com\\_productcatalog/library-files/f3d173a26b0ba1763775f9d1c9606297-e9f319c1b7c611fc41fe17cfa76f19ff-Xpert-HIV-1-Viral-Load-Datasheet-3038-02.pdf](http://www.cephheid.com/administrator/components/com_productcatalog/library-files/f3d173a26b0ba1763775f9d1c9606297-e9f319c1b7c611fc41fe17cfa76f19ff-Xpert-HIV-1-Viral-Load-Datasheet-3038-02.pdf) (2017).
62. Roche. COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test Datasheet, <https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/BloodBloodProducts/ApprovedProducts/PremarketApprovals/PMA/ucm092878.pdf> (2018).
63. Avidor, B. *et al.* Comparison between Roche and Xpert in HIV-1 RNA quantitation: A high concordance between the two techniques except for a CRF02\_AG subtype variant with high viral load titers detected by Roche but undetected by Xpert. *J Clin Virol*. **93**, 15–19 (2017).
64. Mor, O. *et al.* Evaluation of the RealTime HIV-1, Xpert HIV-1, and Aptima HIV-1 Quant Dx assays in comparison to the NucliSens EasyQ HIV-1 v2.0 assay for quantification of HIV-1 viral load. *J Clin Microbiol*. **53**, 3458–3465 (2015).
65. Muenchhoff, M. *et al.* Evaluation of the NucliSens EasyQ v2.0 assay in comparison with the Roche Amplicor v1.5 and the Roche CAP/CTM HIV-1 Test v2.0 in quantification of C-clade HIV-1 in plasma. *PloS One*. **9**(8), e103983, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103983> (2014).
66. Gueudin, M. *et al.* Performance evaluation of the new HIV-1 quantification assay, Xpert HIV-1 Viral Load, on a wide panel of HIV-1 variants. *J Acquir Immune Defic Syndr*. **15**, 521–526 (2016).
67. Bruzzone, B. *et al.* Xpert HIV-1 Viral Load assay and VERSANT HIV-1 RNA 1.5 assay: A performance comparison. *J Acquir Immune Defic Syndr*. **74**, 86–88 (2017).
68. Jordan, J. A., Plantier, J. C., Templeton, K. & Wu, A. H. Multi-site clinical evaluation of the Xpert® HIV-1 viral load assay. *J Clin Virol*. **80**, 27–32 (2016).
69. Ibrahim, M. *et al.* High sensitivity and specificity of the Cepheid Xpert® HIV-1 Qualitative Point-of-Care test among newborns in Botswana. *J Acquir Immune Defic Syndr*. **75**(5), e128–e131, <https://doi.org/10.1097/QAI.0000000000001384> (2017).
70. Gous, N., Scott, L., Berrie, L. & Stevens, W. Options to expand HIV Viral Load testing in South Africa: Evaluation of the GeneXpert® HIV-1 Viral Load assay. *PloS One*. **11**(12), e0168244, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168244> (2016).
71. Moyo, S. *et al.* Point-of-Care Cepheid Xpert HIV-1 Viral Load test in rural African communities is feasible and reliable. *J Clin Microbiol*. **54**, 3050–3055 (2016).
72. Garrett, N. J., Drain, P. K., Werner, L., Samsunder, N. & Karim, S. S. A. Diagnostic accuracy of the Point-of-Care Xpert HIV-1 Viral Load assay in a South African HIV clinic. *J Acquir Immune Defic Syndr*. **72**, 45–48 (2016).
73. Mbonze, N. B. *et al.* Xpert® MTB/RIF for smear-negative presumptive TB: impact on case notification in DR Congo. *Int J Tuberc Lung Dis*. **20**, 240–246 (2016).
74. Haddar, C., Begaud, E., Maslin, J. & Germani, Y. Point-of-care tests for the rapid diagnosis of shigellosis. *Bull Soc Pathol Exot*. **110**, 1–8 (2017).
75. Li, D. *et al.* Evaluation of the GeneXpert for human Monkeypox diagnosis. *Am J Trop Med Hyg*. **96**, 405–410 (2017).
76. Makadzange, A. T. *et al.* A simple phosphate-buffered-saline-based extraction method improves specificity of HIV Viral Load monitoring Using Dried Blood Spots. *J Clin Microbiol*. **55**, 2172–2179 (2017).

## Acknowledgements

We thank patients who participated in the study as well as local professionals responsible for the DBS and data collection of enrolled patients at Monkole hospital in Kinshasa. We also thank to Paul James Erskine Devlin for English editing of manuscript. We thank Patricia Sanz for her technical support during lab processing of DBS samples. This study was funded by fundraising and donations (mainly of Bomberos Ayudan Association), by the Government of Spain (*Fondo de Investigación en Salud-FI*, grants PI16/01908 and PI18/00904) and the Government of Navarre (grant 045-2015). The study was integrated in the research supported by the Spanish HIV infected Paediatric Cohort (CoRISpe) integrated in the Spanish AIDS Research Network and by Instituto de Salud Carlos III, Spanish Health Ministry (Grant no. RD06/0025-ISCIII-FEDER). This study is also included in the “Subprograma de Inmigración y Salud” from CIBERESP (Spain). Xpert VL cartridges to study DBS samples from adult patients were supplied as a donation from Werfen Company.



### Author Contributions

A.H. and G.R. conceived and designed the study, contributed to data analysis and result discussion. A.H. and S.C. collaborated in sample shipping. A.N. selected clinical and epidemiological data from patients in DRC and supervised DBS collection and shipping. M.R. performed the virological analysis of paediatric samples (Xpert VL, Xpert EID, and viral sequencing) and the phylogenetic analysis for variant characterization of the complete study cohort. A.H. supervised phylogenetic analysis. D.B., G.R. and M.F. performed sequencing and HIV-1 viraemia quantification by Roche and Xpert assays from adults and by Roche in children. S.C. collaborated in statistical analysis. A.H. and M.R. designed tables and Figures and wrote the manuscript. A.N., M.F. and S.C. revised the paper and contributed to results discussion. All authors approved the final version.

### Additional Information

**Supplementary information** accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41963-y>.

**Competing Interests:** The authors declare no competing interests.

**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019





OPEN

# Current and historic HIV-1 molecular epidemiology in paediatric and adult population from Kinshasa in the Democratic Republic of Congo

Marina Rubio-Garrido<sup>1,6</sup>, José María González-Alba<sup>2,6</sup>, Gabriel Reina<sup>3</sup>✉, Adolphe Ndarabu<sup>4</sup>, David Barquín<sup>3</sup>, Silvia Carlos<sup>5</sup>, Juan Carlos Galán<sup>2</sup> & África Holguín<sup>1</sup>✉

HIV-1 diversity may impact monitoring and vaccine development. We describe the most recent data of HIV-1 variants and their temporal trends in the Democratic Republic of Congo (DRC) from 1976 to 2018 and in Kinshasa from 1983–2018. HIV-1 *pol* sequencing from dried blood collected in Kinshasa during 2016–2018 was done in 340 HIV-infected children/adolescents/adults to identify HIV-1 variants by phylogenetic reconstructions. Recombination events and transmission clusters were also analyzed. Variant distribution and genetic diversity were compared to historical available *pol* sequences from the DRC in Los Alamos Database (LANL). We characterized 165 HIV-1 *pol* variants circulating in Kinshasa (2016–2018) and compared them with 2641 LANL sequences from the DRC (1976–2012) and Kinshasa (1983–2008). During 2016–2018 the main subtypes were A (26.7%), G (9.7%) and C (7.3%). Recombinants accounted for a third of infections (12.7%/23.6% Circulating/Unique Recombinant Forms). We identified the first CRF47\_BF reported in Africa and four transmission clusters. A significant increase of subtype A and sub-subtype F1 and a significant reduction of sub-subtype A1 and subtype D were observed in Kinshasa during 2016–2018 compared to variants circulating in the city from 1983 to 2008. We provide unique and updated information related to HIV-1 variants currently circulating in Kinshasa, reporting the temporal trends of subtypes/CRF/URF during 43 years in the DRC, and providing the most extensive data on children/adolescents.

Several independent zoonotic transmission events from primates to humans around the beginning of the twentieth century<sup>1</sup> in Central and West Africa gave rise to Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) in the human population, spreading quickly worldwide<sup>2,3</sup>. The HIV epidemic is the result of two types of viruses: HIV-1 and HIV-2, which are closely related to SIV<sub>ptt</sub> and SIV<sub>sm</sub> respectively<sup>4,5</sup>. HIV-1 causes most HIV infections worldwide and has been divided into 4 groups (M, N, O and P)<sup>3,6–8</sup>, but the global HIV epidemic is related to group M, which has been subdivided into 10 subtypes (A–D, F–H, J–L)<sup>1,9,10</sup>, at least 100 Circulating Recombinant Forms (CRF)<sup>11</sup> and uncountable Unique Recombinant Forms (URF). HIV-1 diversity occurred in the early steps in the human adaptation of SIV<sub>ptt</sub><sup>12</sup>.

Since HIV-1 variability can impact transmission, pathogenesis and disease progression<sup>13–15</sup>, HIV monitoring<sup>16,17</sup>, resistance pathways<sup>18</sup>, cognitive impairment<sup>19</sup>, and HIV vaccine development<sup>20</sup>, an accurate HIV-1 variant identification is needed<sup>21</sup>. It can enable a better understanding of global HIV expansion<sup>22,23</sup> and

<sup>1</sup>HIV-1 Molecular Epidemiology Laboratory, Microbiology and Parasitology Department, Hospital Ramón y Cajal-IRYCIS and CIBEResp-RITIP, 28034 Madrid, Spain. <sup>2</sup>Virology Section, Microbiology and Parasitology Department, Hospital Ramón y Cajal-IRYCIS and CIBEResp, 28034 Madrid, Spain. <sup>3</sup>Microbiology Department, Clínica Universidad de Navarra, Navarra Institute for Health Research (IdiSNA), Institute of Tropical Health, Universidad de Navarra (ISTUN), 31008 Pamplona, Spain. <sup>4</sup>Monkole Hospital, Kinshasa, Democratic Republic of the Congo. <sup>5</sup>Department of Preventive Medicine and Public Health, Navarra Institute for Health Research (IdiSNA), Institute of Tropical Health, Universidad de Navarra (ISTUN), Pamplona 31008, Spain. <sup>6</sup>These authors contributed equally: Marina Rubio-Garrido and José María González-Alba. ✉email: gabi@unav.es; africa.holguin@salud.madrid.org

	Children/adolescents (%)	Adults (%)	Total (%)
Subjects with <i>pol</i> sequence	55 (33.3)	110 (66.7)	165 (100)
Female	28 (50.9)	64 (58.2)	92 (55.8)
Age at DBS collection (years), median [IQR]	14.4 [11.4–16.8]	43 [34–53.5]	32.4 [16.2–48.5]
<b>ART exposure</b>			
ARV naive	0	11 (10)	11 (6.7)
ART	55 (100)	69 (62.7)	124 (75.2)
Unknown	0	30 (27.3)	30 (18.2)
<b>HIV-1 viraemia &gt; 1000 HIV-1-RNA copies at sampling (data known in 55 children and in 103 adults)</b>			
In 1 DBS dot [range]	19/55 (34.5) [1260–16,700]	51/103 (49.5) [1200–132,000]	70 (42.4) [1200–132,000]
In 1 ml plasma* [range]	49/55 (89.1) [1351–469,320]	86/103 (83.5) [1008–3,901,478]	135 (81.8) [1008–3,901,478]
<b>Available <i>pol</i> HIV-1 sequences</b>			
PR	36 (65.5)	79 (71.8)	115 (69.7)
RT	49 (89.1)	90 (81.8)	139 (84.2)
IN	40 (72.7)	75 (68.2)	115 (69.7)
<b>Combination of sequences by regions</b>			
Only PR	0	1 (0.9)	1 (0.6)
Only RT	5 (9.1)	8 (7.3)	13 (7.9)
Only IN	6 (10.9)	19 (17.3)	25 (15.1)
PR+RT	10 (18.2)	26 (23.6)	36 (21.8)
RT+IN	8 (14.5)	4 (3.6)	12 (7.3)
PR+RT+IN	26 (47.3)	52 (47.3)	78 (47.3)
<b>HIV-1 variants at <i>pol</i></b>			
Subtype B	1 (1.8)	0	1 (0.6)
Non-B subtypes	28 (50.9)	70 (62.4)	98 (59.4)
CRF	2 (3.6)	19 (17)	21 (12.7)
URF	22 (40)	17 (14.5)	39 (23.7)
U	2 (3.6)	4 (3.6)	6 (3.6)

**Table 1.** Main characteristics of HIV-1 infected population from Kinshasa (DRC) with collected DBS in 2016–2018. DRC, Democratic Republic of Congo; DBS, dried blood specimens; ART, antiretroviral treatment; ARV, antiretroviral drugs; PR, protease; RT, retrotranscriptase; IN, integrase; *pol*, HIV-1 *pol* coding region; CRF, circular recombinant forms; URF, unique recombinant forms; U, unknown variant, not ascribed to pure subtype, CRF or URF. \*Estimated HIV-1-RNA copies considering hematocrit<sup>70,71</sup>.

to infer the evolutionary possibilities in the selection of new variants, such as the recently described subtype L<sup>10</sup>. HIV-1 molecular surveillance studies are globally important and of interest in any setting. However, it is more interesting to analyze HIV molecular diversity in an area with a high viral diversity, especially if the place is the origin of a HIV-1 pandemic, where the virus has been circulating for a longer period and new, more pathogenic or transmissible variants could have arisen. HIV-1 pandemic originated in Central Africa<sup>24</sup>, specifically in the DRC, Kinshasa being the epicenter<sup>12</sup>, spreading to neighboring cities or countries<sup>25</sup>.

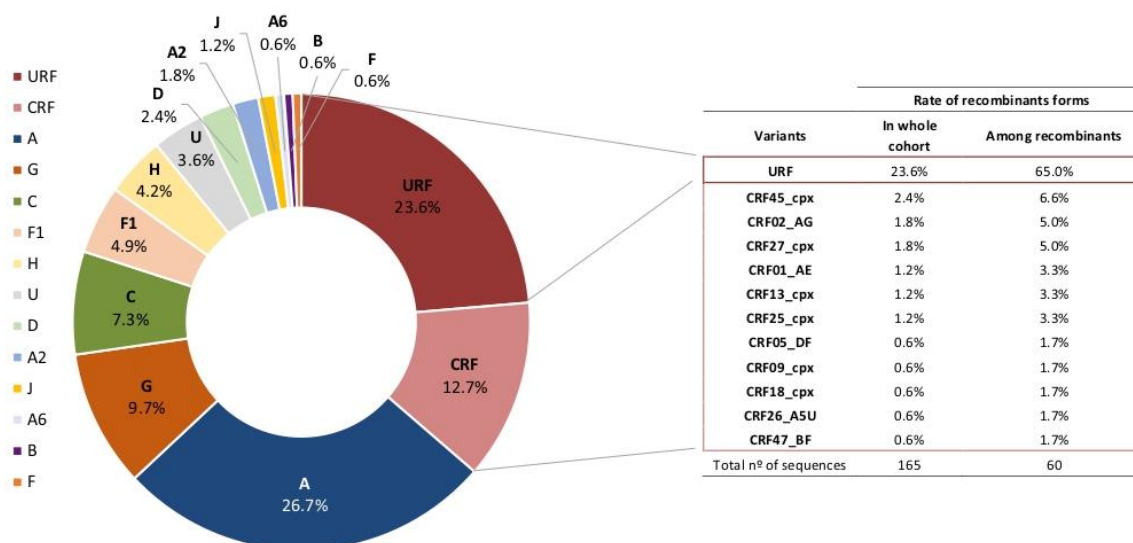
The most ancestral available HIV-1 sequences were recovered from Kinshasa in 1959 (ZR59, near the ancestral node of subtypes B and D)<sup>26</sup>, 1960 (DRC60, subtype A)<sup>1</sup> and 1966, (DRC66, subtype C)<sup>27</sup>. Subtype B also emerged in Kinshasa and was introduced into the Caribbean region via Haiti around 1966 by human migration and later disseminated to other regions, such as the United States of America, Europe, Asia, Latin America, and Australia<sup>23</sup>.

Accordingly, Kinshasa is one of the most relevant places to carry out surveillance programs to increase the knowledge of HIV molecular epidemiology and viral evolution. In that context, our study presents the most recent data related to current circulating HIV-1 variants in *pol* in Kinshasa during the 2016–2018 period, identifying transmission clusters and updating the genetic diversity. In addition, we present a complete review of HIV-1 variant trends in the DRC over 43 years (1976–2018) after using all the historical *pol* sequences available in Los Alamos HIV Sequence Database (LANL) from samples collected in the DRC. We reclassified all HIV-1 variants after new phylogenetic analysis in all downloaded *pol* sequences, including the most recent subtype L and new CRF described in the last years. Later we studied the temporal trends of HIV-1 variants in the DRC and Kinshasa considering the sampling year of each sequence.

## Results

**Current update of HIV molecular epidemiology in the DRC.** We obtained viral *pol* sequences (115 protease, PR, 139 retrotranscriptase, RT and 115 integrase, IN) from 165 (48.5%) of 340 HIV-infected children/adolescents (55, 33.3%) and adults (110, 66.7%) from two hospitals in Kinshasa (DRC) with dried blood specimens (DBS) collected during 2016–2018 (Table 1). Thus, our study was done in 165 patients with available *pol*





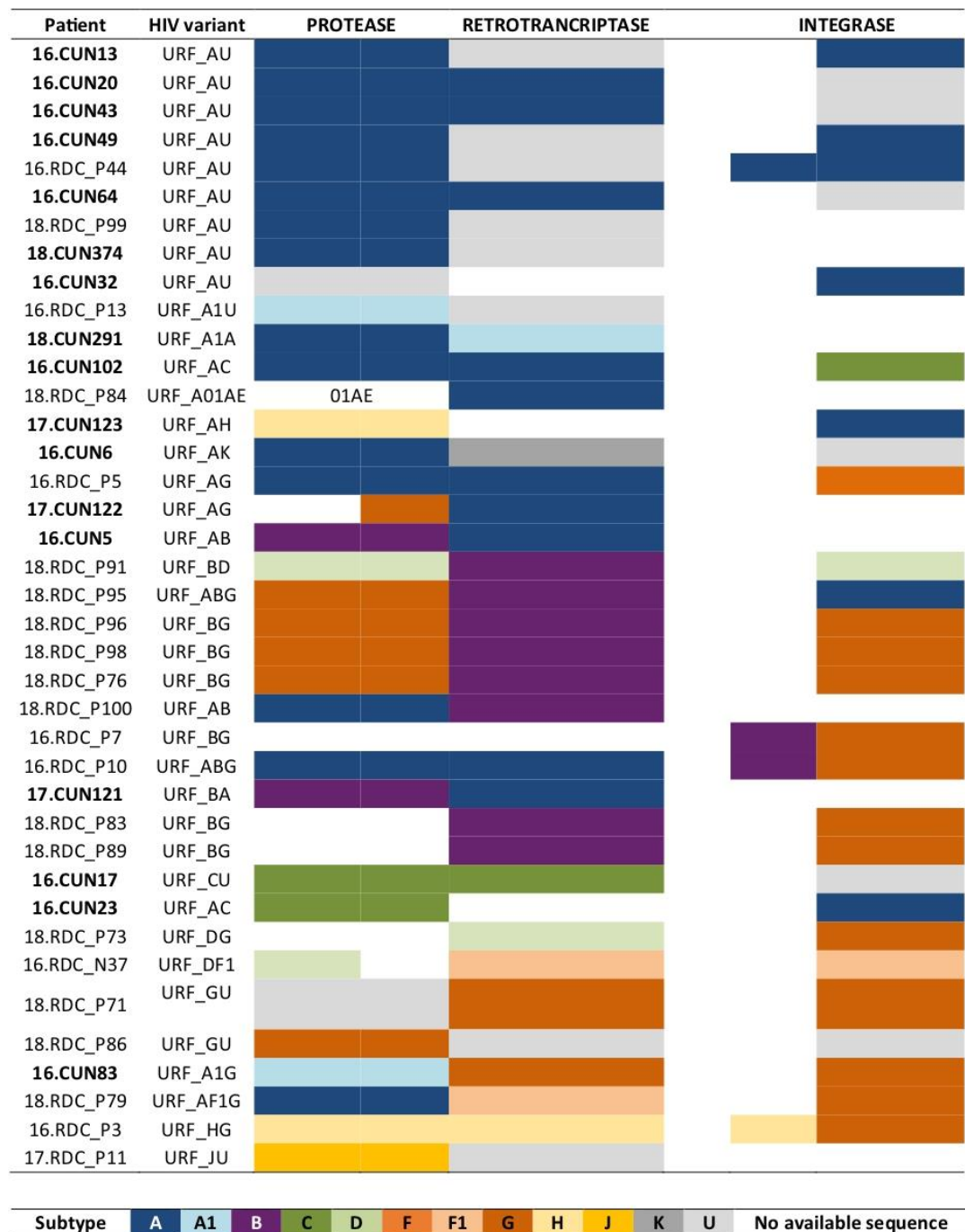
**Figure 1.** Current molecular epidemiology characterization in our HIV-1 study cohort from Kinshasa (DRC) with collected DBS in 2016–2018. Percentages calculated considering new HIV-1 *pol* sequences recovered from DBS of 165 HIV-1 infected subjects from Kinshasa during 2016–2018.

sequence. The median age [IQR] at DBS collection for children and adults was 14.4 [11.4–16.8] and 43 [34–53.5] years old, respectively. Around 75% of subjects with available *pol* sequence were under antiretroviral treatment (ART) and 8 out of 10 presented more than 1000 HIV-1 RNA copies/ml at sampling (Table 1).

From the historical database, we recovered 5672 group M *pol* sequences without gaps or ambiguities available in LANL, 4090 of them being assigned to HIV-1 pure subtypes (300 A, 2476 B, 1133 C, 72 D, 48 E, 45 G, 7 H, 5 J, 1 K, 3 L) and 1582 circulating recombinant forms CRF\_01 to CRF\_99. As expected, most (99.4%) viral sequences from the 165 subjects were classified as HIV-1 non-B variants in *pol* coding region. Among them, 59.4% were 9 pure non-B subtypes, 36.4% recombinant forms (23.7% URFs and 12.7% CRFs) and 3.6% unique unclassifiable (U) sequences. The most frequent HIV-1 variant was subtype A (26.7%), followed by subtypes G (9.7%) and C (7.3%) (Fig. 1 and Sup. Fig. 1). The most prevalent CRF were CRF45\_cpx (2.4%), CRF02\_AG (1.8%) and CRF27\_cpx (1.8%) in our cohort. Interestingly, we identified for the first time the CRF47\_BF variant in the DRC, infecting an 8 year-old child. Among recombinant forms, URF accounted for 65% of infections in our study cohort (2016–2018). These URF were in circulation in Kinshasa during 2016–2018. Recombination patterns in the analyzed *pol* fragments assigned to URF among the 39 subjects is described in Fig. 2. When specific HIV-1 variants were compared between age groups, adults presented a greater number of different CRF (11 variants) than children/adolescent group (2 CRF: CRF27\_cpx and CRF47\_BF). Although the children/adolescent group presented less diversity, they had almost 3 times as many URF infections than adults (40% vs. 14.5%;  $p < 0.05$ ). The rate of pure subtypes was similar across both groups.

**Cluster identification between non-epidemiologically related adults and children/adolescents.** Among the 165 *pol* sequences from Kinshasa we identified 4 independent transmission clusters (Table 2 and Sup. Fig. 2–5) supported by 100% bootstrap, presenting recent transmission (genetic distance lower than 0.01) in three of them: cluster 1, cluster 3 and cluster 4. Infected individuals from clusters 1, 2 and 3 carried subtype A *pol* sequences, although they were not ascribed to previously characterized sub-subtypes A or CRF including A at *pol* coding region. They appeared in 3 different branches in PhyML trees after including all LANL sequences ascribed to subtype A and their sub-subtypes circulating in the DRC since 1976 (Sup. Fig. 2–4). Subjects from cluster 4 harbored subtype H viruses, clustering apart from other subtype H LANL sequences from the DRC (Sup. Fig. 5). Table 2 shows the epidemiological data collected from clinical reports of each patient. All clusters included 2 subjects, except cluster 1 including a 34.7 year-old woman, a 6.2 year-old boy and a 14.3 year-old adolescent male with no reported epidemiological link (Sup. Fig. 2). Clusters 2 and 3 included two adults and cluster 4 two children.

**Transmission networks involved a common recombinant fragment in recent paediatric/adolescents sequences from Kinshasa.** Among the 165 new sequences (2016–2018), we found the presence of a transmission network, including two different clusters (RecG and RecB) of 17 viruses sharing one *pol* fragment (Table 3 and Sup. Fig. 6). Interestingly, all viruses involved were collected from paediatric patients with no epidemiological linkage according to clinical reports. Cluster RecB included viruses sharing a fragment of 599 nt in RT (positions 2935–3534 in HXB2) assigned to subtype B, in 8 patients ranging from 9 to 18 years-old. Cluster RecG included viruses from 9 adolescents from 10 to 19 years-old sharing a fragment in IN (positions 4390–



**Figure 2.** Recombination structure of the available *pol* sequences assigned to URF and recovered from 39 HIV-1 infected subjects in Kinshasa (2016–2018). This figure represents a simplified URF structure. In bold, viruses collected from adults. The remaining, viruses collected from children/adolescents.

5005 in HXB2) of 615 nt assigned to subtype G (Table 3). Of note, one *pol* sequence from a 19 year-old female (18.RDC\_P83) shared fragments of both clusters (Sup. Fig. 6). The common progenitor viruses for clusters RecG and RecB using PhyML trees were not found in all 2802 LANL sequences from the DRC. We also observed a



Cluster n°	Patients data				Cluster data				
	Involved subjects	Group of age	Age at sampling	Gender	HIV-1 variant	Analized nts	Bootstrap (%)	Genetic distance**	PhyML tree
1	16.RDC_P33	Adolescent	14.3	M	A*	1270	100	0.02***	Sup.Fig 2
	18.RDC_P64	Child	6.2	M					
	18.CUN288	Adult	34.7	F					
2	16.CUN24	Adult	57.7	F	A*	1279	100	0.05	Sup.Fig 3
	16.CUN82	Adult	62.3	M					
3	16.CUN28	Adult	50.6	F	A*	649	100	0.003	Sup.Fig 4
	16.CUN32	Adult	37.6	F					
4	16.RDC_P3	Child	10.2	M	H	1269	100	0.005	Sup.Fig 5
	17.RDC_P49	Child	9.7	F					

**Table 2.** Clusters identification in the studied population from Kinshasa in the 2016–2018 period. Nts, nucleotides; Sup, supplementary; Fig, figure; M, male; F, female. \*Subtype A sequences not ascribed to previously characterized sub-subtypes A or CRF including A at *pol* coding region recovered from patients in the DRC with available LANL sequences. \*\*We considered recent transmission when genetic distance was lower than 0.01. \*\*\*Genetic distance <0.01 comparing P64 and CUN288.

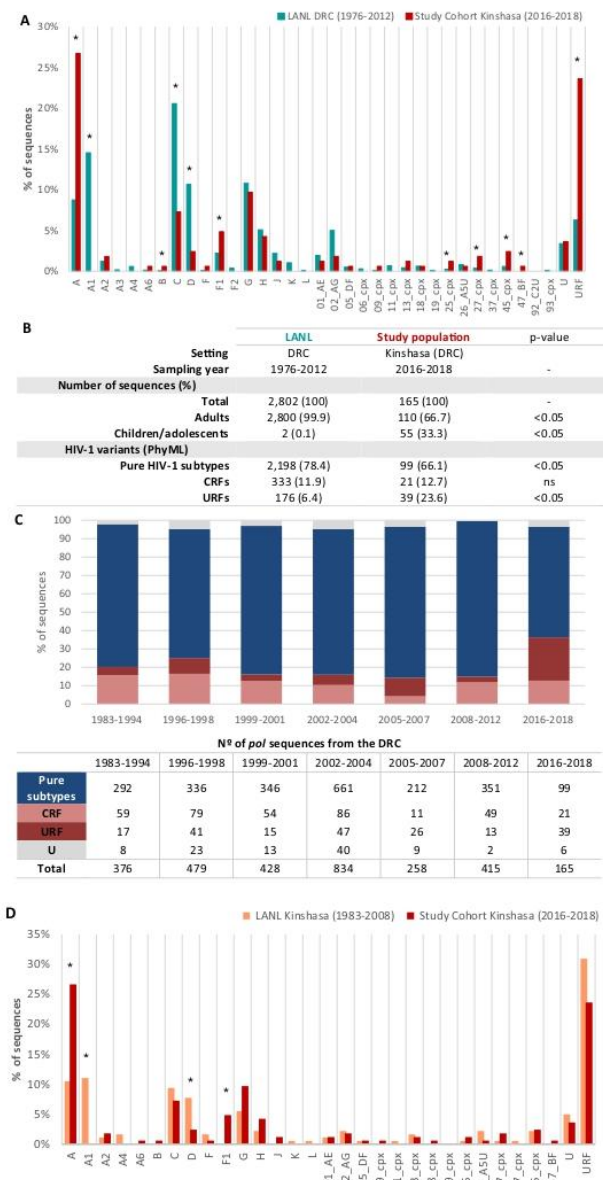
recombination event at protease coding region involving viruses from 2 adults (subtype A, CUN131 and subtype H, CUN127), leading to URF\_A virus infecting CUN123 (Sup. Fig. 7).

**Reclassification of HIV-1 variants with LANL sequence circulating in the DRC since 1976.** In order to increase the number of *pol* sequences from the DRC, we downloaded all 2802 available *pol* sequences in LANL, which had been collected since 1976 to 2012, mainly (99.9%) from adults (Fig. 3). Then, since new HIV-1 variants have appeared in the recent years, we reclassified the 2641 pure subtypes and CRF, excluding 161 URF, performing the same PhyML analysis and reference sequences set in the historic LANL database from the DRC as in our sequences collected in Kinshasa from 2016–2018. Interestingly, we found some discrepancies in the HIV-1 variant classification in 8.8% (198 sub-subtype A1 and 34 U) of them, which had probably been misclassified due to less available reference HIV-1 sequences and to the absence of new subtypes and new CRF when they were classified. The new PhyML analysis revealed that 198 (32.9%) of the 602 sequences originally appointed as sub-subtype A1 in LANL were, in fact, other HIV-1 variants, 101 being subtype A (51%), 88 CRF02\_AG (44.4%), 3 CRF11\_cpx (1.5%), 3 CRF25\_cpx (1.5%), 1 sub-subtype A6 (0.5%), 1 sub-subtype F1 (0.5%) and 1 U (0.5%). Among the 34 (26.6%) of 128 U LANL sequences from the DRC, 12 turned out to be subtype A (35.3%), 4 sub-subtype F1 (11.8%), 3 sub-subtype A4 (8.8%), 3 sub-subtype A5 (8.8%), 3 subtype D (8.8%), 3 CRF18\_cpx (8.8%), 2 subtype K (5.9%), 1 CRF02\_AG (2.9%), 1 subtype G (2.9%), 1 subtype H (2.9%), and 1 (0.5%) subtype L. Thus, one third (32.9%) of sub-subtype A1 and a quarter (26.6%) of U LANL sequences from the DRC had been previously misclassified.

**Changes in the HIV-1 molecular epidemiology in the DRC (1976–2018) and in Kinshasa (1983–2018).** In order to analyze the HIV-1 molecular epidemiology evolution over time in the DRC, we compared the current HIV-1 variants in *pol* circulating in Kinshasa (2016–2018) with the 2588 *pol* sequences previously reported in the country with known sampling year (1976–2012) and newly reclassified in this study. Globally, a significant reduction ( $p < 0.05$ ) in the percentage of pure subtypes and simultaneously an increase of URFs ( $p < 0.05$ ), were observed after comparing both periods, whereas the proportion of CRFs remained similar across both sequence sets (Fig. 3A, B). The evolution of pure subtypes and recombinant forms in the DRC across a three-year period until 2018 is shown in Fig. 3C.

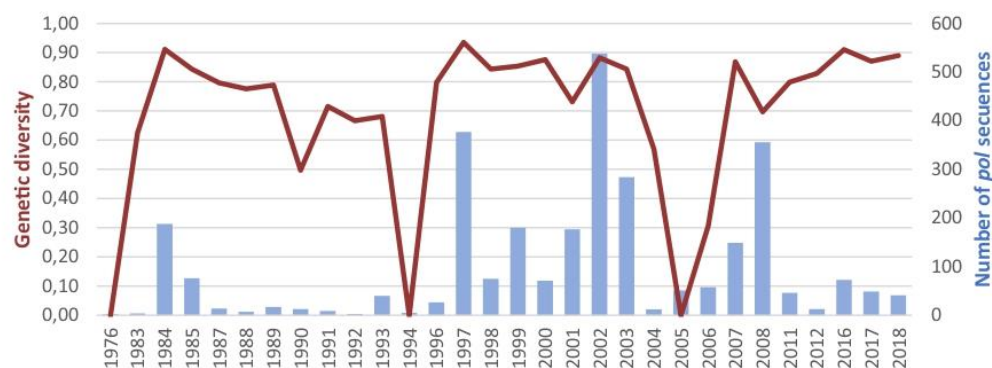
HIV-1 variant distribution varies greatly between provinces and it is not possible to compare the diversity in Kinshasa with that of the whole country. We therefore performed a new analysis using all available *pol* sequences deposited in LANL recovered from samples collected in Kinshasa after identifying the accession numbers in the corresponding papers, recovering 181 *pol* sequences from different subjects. We then compared the HIV-1 variant distribution in Kinshasa from the 181 samples collected exclusively in the city during 1983–2008 (94.5% of them sampled during 2007–2008) versus the new 165 *pol* sequences collected during 2016–2018 in Kinshasa and newly reported in this study. We observed during 2016–2018 a significant increase in subtype A (10.5% vs. 26.7%,  $p < 0.05$ ) and sub-subtype F1 (0% vs. 4.8%,  $p < 0.05$ ) and a significant reduction in sub-subtype A1 (11% vs. 0%,  $p < 0.05$ ) and subtype D (7.7% vs. 2.4%,  $p < 0.05$ ) compared to variants from Kinshasa circulating from 1983 to 2008, whereas the proportion of CRFs remained similar across both sequence sets (12.1 vs. 13.2%, respectively). We detected CRF47\_BF virus for the first time in the country using *pol* sequences collected after 2016. URF tended to decrease over time (31% vs. 23.6%). The remaining variants remained stable over time (Fig. 3D).

**Differences on genetic diversity across *pol* sequences sets from the DRC.** The global genetic diversity across the 2802 LANL *pol* sequences (1976–2012) versus our 165 *pol* sequence set under study (2016–



**Figure 3.** Comparison of HIV-1 variants in the study cohort (2016–2018) versus LANL sequences from the DRC (1976–2012) and Kinshasa (1983–2008). **(A)** Comparison of HIV-1 variants in the study cohort from Kinshasa (2016–2018) versus DRC sequences available in LANL (1976–2012). **(B)** Comparison of data between study cohort and LANL. **(C)** Evolution of pure subtypes and recombinant forms in the DRC by periods of time during 1983–2018. Panel C excludes *pol* sequences from the DRC sampled during 1977–1982, 1986, 1995, 2009, 2010, 2013–2015, due to their absence in LANL database. We clustered all sequences sampled during 1983–1994 as an “early period” to avoid biases due to the non-representative number of *pol* sequences each year within that period. Panels B and C exclude 214 LANL sequences from the DRC with unknown sampling time collected before 2012. **(D)** Comparison of HIV-1 variants distribution circulating in Kinshasa during 1983–2008 versus 2016–2018. For analysis we used the 181 *pol* sequences with available GenBank accession number from samples collected in that city during 1983–2008 versus the new 165 *pol* sequences collected during 2016–2018 reported in this study. Cpx, complex; CRF, circulating recombinant form; URF, unique recombinant form. \**p* value < 0.05.





**Figure 4.** Temporal trends of genetic diversity across years in HIV-1 *pol* sequences from the DRC. Bars in blue, available *pol* sequences from the DRC with known sampling year. LANL database did not include *pol* sequences from the DRC sampled during 1977–1982, 1986, 1995, 2009, 2010, and 2013–2015.

Recombination network	Patients	Age (years)	Gender	Sampling year	Mother's HIV status	HIV-1 variant at <i>pol</i>	HIV <i>pol</i> nucleotides (HXB2)				
							Region	PR	RT		IN
							Frag. 2253	1 2934	2 3534	3 3704 4389	4 5005
RecB	RDC_P91	12.8	M	2018	Positive	URF_BD					
	RDC_P96	17.5	F	2018	Positive	URF_BG					
	RDC_P95	11.1	M	2018	Positive	URF_ABG					
	RDC_P98	18.6	F	2018	Positive	URF_BG					
	RDC_P76	9.4	F	2018	Positive	URF_BG					
	RDC_P100	17.2	F	2018	Positive	URF_AB					
RecB-G	RDC_P89	14.7	F	2018	Negative	URF_BG					
	RDC_P83	17.1	F	2018	Unknown	URF_BG					
	RDC_P73	19.1	F	2018	Negative	URF_DG					
RecG	RDC_P71	14.8	F	2018	Negative	URF_GU					
	RDC_P5	11.6	F	2016	Positive	URF_AG					
	RDC_P7	16.1	F	2016	Unknown	URF_BG					
	RDC_P10	11.6	F	2016	Positive	URF_ABG					
	RDC_P50	11.7	F	2017	Unknown	G					
	RDC_P35	11.4	M	2016	Positive	G					
	RDC_P3	10.2	M	2016	Unknown	URF_HG					
	RDC_P49	9.7	F	2017	Unknown	H					

Subtype A B D G H U No available sequence

**Table 3.** Description of recombination transmission net found among the 165 HIV-1 variants collected in Kinshasa from 2016 to 2018. RecB, recombination network sharing 599 nts subtype B fragment in RT; RecG, recombination network sharing 615 nts subtype G fragment in IN; M, male; F, female; frag., fragment. Analysed *pol* fragment (numbering according to HXB2): 1, positions 2253–2934 (in protease); 2, positions 2935–3534 (in reverse transcriptase); 3, positions 3704–4389 (in RNase H); 4, positions 4390–5005 (in integrase).

2018) reported similar values (0.90 vs. 0.91) (Table 4). However, considering specific HIV-1 variants, LANL set presented higher genetic diversity in pure-subtypes (0.84 vs. 0.76), whereas diversity of CRFs was higher since 2016 (0.78 vs. 0.89). When the genetic diversity was compared into the most recent sequences, according to age group, it was higher in children/adolescents than adults (0.92 vs. 0.88), mainly in URF variants (0.93 vs. 0.80), whereas in CRFs the diversity was higher in adults versus children/adolescents (0.88 vs. 0.50) (Table 4). Figure 4, shows the high genetic diversity over time in *pol* sequences sampled in the DRC since the 1976 (year of first available *pol* sequence) to 2018, with some variations by periods of time.

	LANL DRC 1976–2012	Study cohort Kinshasa 2016–2018		
		Total	Children/adolescents	Adults
Total	0.90 (n = 2802)	0.91 (n = 165)	0.92 (n = 55)	0.88 (n = 110)
Pure subtypes	0.84 (n = 2198)	0.76 (n = 99)	0.73 (n = 29)	0.75 (n = 70)
CRF	0.78 (n = 333)	0.89 (n = 21)	0.50 (n = 2)	0.88 (n = 19)
URF	0.95 (n = 176)	0.92 (n = 39)	0.93 (n = 22)	0.80 (n = 17)

**Table 4.** Genetic diversity by study groups in HIV-1 *pol* sequences from the DRC. CRF, circulating recombinant form; URF, unique recombinant form; n, number of *pol* sequences; LANL, Los Alamos HIV Sequence database.

## Discussion

The DRC is known as the origin of HIV-1 pandemic and the epicenter for the selection and spreading of many HIV-1 variants to neighboring countries<sup>28</sup>. As a consequence of high HIV-1 genetic heterogeneity (probably the highest diversity rate in the world), the accurate phylogenetic reconstructions have not been easy to interpret<sup>29</sup>. For this reason, our first approach was to reanalyze the available HIV-1 sequences deposited in LANL from the DRC, observing 8.8% of misclassified sequences according to the new reclassification of HIV-1 variants and phylogenetic programs used in this work.

Global geographical patterns in HIV-1 variants distribution are changing over time due to several factors, such as population movements or the dense transmission networks. These factors are contributing to an unpredictable HIV-1 pandemic<sup>30,31</sup>. Consequently, a continuous and accurate molecular epidemiology surveillance is necessary for increasing our knowledge about the evolving HIV-1 epidemic, especially in those geographical areas with high genetic diversity rate, where multiple HIV-1 variants co-circulate<sup>20,32</sup>, such as the DRC. In these settings, the selection of new recombinant forms is easier and the viral evolution could be faster than in those regions with low diversity of HIV-1<sup>33</sup>.

Due to the lack of updated data on HIV molecular epidemiology in the DRC, we present the information of 165 *pol* sequences obtained in adult and paediatric populations, representing the most recent data on circulating HIV-1 subtypes and recombinant forms in Kinshasa ranging 2016–2018. We also compared the temporal trends of HIV-1 variants in the DRC for a 43-years period, based on 28<sup>1,10,24,28,29,34–56</sup> published studies. Sup. Table 1 shows the sampling year, sample type, study population, number of analyzed sequences, coding regions, subtyping method and sequence submission to databases in each 28 published studies characterizing HIV-1 variants in the DRC. Since HIV is prone to recombination during retrotranscription, high levels of recombinant forms after coinfections or superinfections are expected, especially in places with high viral diversity, such as in the DRC<sup>24,34</sup>. In this scenario HIV-1 can accelerate adaptation to the host, favouring emerging variants with unknown pathogenicity<sup>57</sup>.

Previous studies have also reported heterogeneous geographic distribution of group M variants across regions in the DRC<sup>58</sup>, with high prevalence of recombinants. However, HIV recombinant rates in our study and previously reported in the country could be underestimated since most of them were classified by using short partial genome sequences (Sup. Table 1) and not full genomes. Thus, the recombinant rate in the DRC could be even higher if more viral regions are assessed. Although the biological and clinical impact remains to be clarified, there is growing evidence that recombination has played a significant role in the early history of the HIV-1 pandemic and in viral evolution<sup>59</sup>. We reported the first identification of CRF47\_BF in Africa and the DRC, a recombinant variant first described in Spain<sup>60</sup>. It would also suggest a possible importation of subtype B to the DRC.

This study confirmed subtype A as the most prevalent subtype, which has maintained a high rate of infections in the DRC over the last three decades<sup>61</sup>, explaining the high rate of URF carrying subtype A fragments circulating in Kinshasa described in the last years. Kinshasa has been proposed as the origin of A, G and F1 subtypes<sup>28</sup>, common found HIV-1 variants in our series. Although subtype D was associated with faster disease progression<sup>13</sup>, was also initially emerged in Kinshasa, its prevalence decreased in the city during 2016–2018 compared to previous years. Although a significant increase of subtype C was reported from 1997 to 2002 in Kinshasa<sup>38</sup>, in other countries close to the DRC<sup>62</sup> and worldwide<sup>15</sup>, we observed a similar prevalence of this variant in Kinshasa comparing the two time periods under study. The reasons for these findings are unknown.

We also found that almost 4 out of 10 variants circulating in Kinshasa during both periods (1983–2008 and 2016–2018) carried recombinant sequences in *pol*. When CRFs and URFs diversities were analysed according to age of patients, CRFs diversity in *pol* was higher in adults and URF diversity higher in children/adolescents in the last period. The trends of HIV-1 genetic diversity should be further explored in the coming years, also including other HIV-1 genes. The high misclassification in sub-subtype A and U *pol* sequences from the DRC deposited in LANL reveals the need for reclassification by phylogeny with updated reference sequence sets and new reported HIV-1 variants.

Phylogenetic approaches and distance-based analysis represent the most common strategy to identify recent transmission networks<sup>63</sup>, and it could be useful to identify other HIV infected and uninfected persons at highest risk of transmission who could benefit from HIV prevention interventions<sup>64</sup>. Some reports have demonstrated that genetic distance restrictive thresholds between 0.01 and 0.02 substitutions per site have been more strongly



associated with probable transmission partners than traditional epidemiological connections<sup>65–67</sup>, and a distance of 0.015 could serve as a use proxy for epidemiological relatedness in a surveillance setting<sup>66</sup>. Our study identified that 3 out of 4 transmission clusters were recent (genetic distance thresholds 0.01–0.02<sup>65–67</sup>). We implemented a strategy based on traceability of genetic fragments, to know the potential network among infected people (Sup. Fig. 6). This strategy, “recombination network”, gave us a dense net and probably a more complete view. The recombination network found involving *pol* sequences from 17 children/adolescents with no epidemiological link according to clinical data confirmed the important role of recombination in an HIV pandemic and the importance of common ancestor identification to understand recombination origin and spread. As the children are overrepresented in this network, we should suspect that this network is even denser.

This study has some limitations that need to be considered. Firstly, samples from 2016–2018 were collected in two reference hospitals in Kinshasa, which cannot be fully representative of the situation in a city and even more at a country-wide level<sup>58</sup>. However, the inclusion of all *pol* sequences from LANL collected in the country over more than 4 decades, from the general population and risk groups, provides a good overview of the huge diversity of the country. A second limitation is the length of recovered *pol* sequences, which differed across samples, complicating bioinformatic analysis. A third limitation is that some reports in the DRC did not submit sequences to databases, and they were not available in LANL (Sup. Table 1). These reported HIV-1 variants could therefore not be reevaluated by new PhyML analysis to be included in the temporal trend analysis of HIV-1 variants. Thus, we encourage the necessity of sequence submission in all HIV epidemiology studies worldwide before publication, and the inclusion of the sampling year in all submitted sequences, absent in 214 (8%) of *pol* sequences downloaded from LANL in that country. The lack of routine resistance testing during clinical follow-up of HIV-infected subjects in the DRC limits the *pol* sequences availability in the DRC. Furthermore, the lack of complete epidemiological information from subjects involved in transmission or recombination clusters limits full understanding of a cluster’s origin. Finally, 51.5% of DBS did not yield any viral sequences, possibly due to the low viral load (40–1000 HIV-1 RNA copies/dot) in more than half of specimens and to the low plasma volume in the 2 dots used for HIV-1 RNA extraction, limiting the ability to get positive PCR amplifications of HIV in these samples.

Since none of sequences downloaded from LANL was sampled after 2012, our sequence set was the most recent in the DRC to date and the highest in number of analyzed *pol* sequences in Kinshasa. Our study reinforces the use of dried blood as a field-friendly, useful, convenient and alternative specimen type to whole blood or plasma in HIV molecular epidemiology surveillance studies in developing countries or settings with limitations as regards the collection, storing, transportation of plasma or when low blood volume is available<sup>68</sup>. Only 3 of 27 studies reporting variants in the DRC<sup>48,50,51</sup> had used DBS for HIV-1 variant characterization (Sup. Table 1). Although two previous studies reported the full HIV-1 genome (including *pol*) from a vertically infected 12-month-old baby<sup>54</sup> or *gag* sequences from 15 children in Kimpese, rural DRC<sup>53</sup>, our study presents the most extensive data regarding HIV-infected children and adolescents in the country. The updated high genetic diversity observed in the DRC also represents a real challenge for future vaccine development and for efficiency of antiretroviral treatment, diagnostic and monitoring tests of HIV infection<sup>69</sup>.

In conclusion, we report the most recent data related to HIV-1 variants circulating in Kinshasa, the geographical origin of the pandemic, and unique and updated information on the temporal trends of HIV-1 subtypes, CRF and URF in the DRC during 43-year period (from 1976 to 2018) and in Kinshasa from 1983–2018 after reclassification of several available LANL sequences using phylogenetic approach. The data provided increase and update the knowledge of HIV molecular epidemiology in the DRC. Active transmission clusters were detected, and a new strategy offers us a more complete view of transmission networks. Of concern is an overrepresentation of children was observed in the recombination network. Continued molecular surveillance will be essential to determine and trace rare unique recombinant forms or emerging strains of HIV in the country.

## Material and methods

**Sample collection and viral load quantification.** From 2016 to 2018, 2 DBS cards were collected from 340 patients under clinical follow up at Monkole and Kalembelembe Hospitals (Kinshasa, DRC), 71 HIV-infected children (0–14 years) and adolescents (15–21 years) and 269 HIV-infected adults (more than 22 years). DBS preparation and viral load quantification was performed using Cobas Ampliprep/Cobas Taqman HIV-1 test v2.0 (Roche) as previously reported<sup>50</sup> considering hematocrit<sup>70,71</sup>.

**Amplification and sequencing.** For HIV-1 variant characterization, viral RNA was extracted from 2 DBS dots using NucliSENS EasyMAG automated platform (BioMérieux) or manual High-Pure Viral Nucleic Acid kit (Roche). The encoding regions PR, RT, and/or IN at HIV-1 *pol* gene were amplified by RT-PCR and nested-PCR using primers designed by WHO<sup>72</sup> and ANRS<sup>73</sup>. PCR amplicons were purified using the Illustra ExoProStar 1-Step (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK) and sequenced by Macrogen Inc. (Geumchun-gu, Seoul, Korea). Viral sequences included the complete HIV-1 PR (codons 1–99), partial RT (codons 1–335/440) and IN (codons 1–285).

**Accession numbers.** PR, RT and IN HIV-1 sequences were submitted to GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)) with the following accession numbers: MH920378–MH920435, MN530990–MN531082, MN998509–MN998523.

**Phylogenetic analysis.** Nucleotide sequences were translated and aligned using the ClustalW algorithm implemented in MEGA6. For HIV-1 subtype characterization we used sequences available in Los Alamos HIV Sequence Database (LANL: <https://www.hiv.lanl.gov>), annotated by country of origin and date. Reference



sequences from all HIV-1 variants described to date with available sequence were included (groups, subtypes, sub-subtypes, CRFs). One HIV-1 group N sequence was used as an outgroup. Sequences from groups P/O/N were also downloaded to discard non group-M infections. To alleviate the burden of computer-time required to reconstruct large phylogenies fast algorithms, phylogenetic trees (PhyMLtree) were reconstructed by maximum-likelihood (ML) method with RAXML v8.0 (Randomized Axelerated Maximum Likelihood)<sup>74</sup> using the general time reversible plus proportion of invariable sites plus gamma distribution parameter (GTR+I+G) evolutionary model. To estimate the bootstrap values on the inferred topology by RAXML, Shimodaira-Hasegawa (SH) test using FastTree program was used (support > 90%)<sup>75</sup>. Sequences not clustering with any variant were analyzed using Recombination Detection Program (RDP3v4.13)<sup>76</sup>, identifying the subtypes involved in eventual recombination events and hypothetical recombination breakpoints. To further confirm the detected putative recombination events, new phylogenetic analyses were performed using the sequence fragments assigned to different subtypes according to the proposed breakpoint position(s) defined by RDP3. The topologies obtained with each fragment were compared to SH, expected likelihood weight, and Kishino-Hasegawa tests using the TREE-PUZZLE 5.2 program. In the positive cases, the recombinant sequences were redefined as URFs; otherwise, sequences with a most recent common ancestor to subtypes sub-subtypes A1-A6 or F1-F2 were identified as subtypes A or F, respectively. The remaining cases were appointed as U. Since it was not possible to sequence the same fragment for all sequences, different regions were analyzed separately.

Transmission clusters in our 165 study sequences from Kinshasa (2006–2018) were defined as viral sequences belonging to the same subtype/CRF/URF and grouped into a single and well-supported cluster (monophyletic clade) with 100% bootstrap values. When only partial *pol* sequences could be recovered from new samples, each available sequence fragment present in all viruses from the cluster was used for analysis separately. In this way, new recombination events were detected. Sequences with different recombination events but sharing some recombinant fragment and common progenitor virus were considered as transmission networks.

Genetic diversity ( $D = 1 - \Sigma f^2$ ) of HIV variants in the DRC was analyzed over time, a measure of variability that takes into account the frequencies ( $f$ ) of all variants. For that purpose, all 2802 *pol* LANL sequences from the DRC were downloaded and reclassified as previously described. Among them, 2588 (92.3%) reported the sampling year, all belonging to the 1976–2012 period. Viral genetic diversity among HIV-infected children and adults with samples collected in Kinshasa between 2016 and 2018 was also calculated. We analyzed the genetic distance (number of base substitutions per site) or the average evolutionary divergence over all sequence pairs by using the Tamura-Nei model 93 (TN93)<sup>77</sup>, according to previous reports<sup>67</sup>. The rate variation among sites was modeled with a *gamma* distribution and analysis was conducted in MEGA6. We identified a recent transmission cluster in *pol* sequences showing maximum pairwise genetic distance lower than 0.01, according to previous reports<sup>65–67</sup>. TN93 was used because it is the most general nucleotide substitution model for which distances can be estimated directly from counts of nucleotide pairs in aligned sequences.

**Ethical aspects.** The project was approved by the Human Subjects Review Committees at Monkole Hospital/University of Kinshasa (Kinshasa, DRC), University Hospital Ramón y Cajal (Madrid, Spain) and University of Navarra (Pamplona, Spain). Informed consent of all enrolled adults and of parents or guardians of enrolled children was obtained. All methods were carried out in accordance with relevant guidelines and regulations. Patients' names were codified at sampling to maintain confidentiality.

**Statistical analysis.** Differences in prevalence of HIV-1 variants were tested using T-test and *p* values < 0.05 were considered statistically significant. Descriptive statistical analysis was performed, median and interquartile range (IQR) was also calculated. Statistical analyses were conducted using Prism 6.0 software from GraphPad version 8.0.1 (San Diego, CA, USA).

Received: 5 June 2020; Accepted: 30 September 2020

Published online: 28 October 2020

## References

1. Worobey, M. *et al.* Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960. *Nature* **455**, 661–664 (2008).
2. UNAIDS. AIDSinfo. <https://aidsinfo.unaids.org/>.
3. Barré-Sinoussi, F. *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Rev. Invest. Clin.* **56**, 126–129 (2004).
4. Gao, F. *et al.* Human infection by genetically diverse SIVSM-related HIV-2 in West Africa. *Nature* **358**, 495–499 (1992).
5. Gao, F. *et al.* Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* **397**, 436–441 (1999).
6. Simon, J. H. M., Gaddis, N. C., Fouchier, R. A. M. & Malim, M. H. Evidence for a newly discovered cellular anti-HIV-1 phenotype. *Nat. Med.* **4**, 1397–1400 (1998).
7. Plantier, J. C. *et al.* A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat. Med.* **15**, 871–872 (2009).
8. De Leys, R. *et al.* Isolation and partial characterization of an unusual human immunodeficiency retrovirus from two persons of west-central African origin. *J. Virol.* **64**, 1207–1216 (1990).
9. Robertson, D. L. HIV-1 nomenclature proposal. *Science* **288**(5463), 55–56 (2000).
10. Yamaguchi, J. *et al.* Complete genome sequence of CG-0018a-01 establishes HIV-1 subtype L. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **83**(3), 319–322 (2020).
11. Los Alamos HIV Sequence Database. HIV Circulating Recombinant Forms (CRFs). <https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html#CRF01>.
12. Faria, N. R. *et al.* The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. *Science* **346**, 56–61 (2014).

13. Baeten, J. M. *et al.* HIV-1 subtype D infection is associated with faster disease progression than subtype A in spite of similar plasma HIV-1 loads. *J. Infect. Dis.* **195**, 1177–1180 (2007).
14. Amornkul, P. N. *et al.* Disease progression by infecting HIV-1 subtype in a seroconverter cohort in sub-Saharan Africa. *AIDS* **27**, 2775–2786 (2013).
15. Venner, C. M. *et al.* Infecting HIV-1 subtype predicts disease progression in women of sub-Saharan Africa. *EBioMedicine* **13**, 305–314 (2016).
16. Price, M. A. *et al.* Control of the HIV-1 load varies by viral subtype in a large cohort of African adults with incident HIV-1 infection. *J. Infect. Dis.* **220**, 432–441 (2019).
17. Alvarez, P. *et al.* HIV-1 variability and viral load technique could lead to false positive HIV-1 detection and to erroneous viral quantification in infected specimens. *J. Infect.* **71**, 368–376 (2015).
18. Bhargava, M., Cajas, J. M., Wainberg, M. A., Klein, M. B. & Pai, N. P. Do HIV-1 non-B subtypes differentially impact resistance mutations and clinical disease progression in treated populations? Evidence from a systematic review. *J. Int. AIDS Soc.* **17**, 18944 (2014).
19. Sacktor, N. *et al.* HIV Subtype D is associated with dementia, compared with subtype A, in immunosuppressed individuals at risk of cognitive impairment in Kampala, Uganda. *Clin. Infect. Dis.* **49**, 780–786 (2009).
20. Carr, J. K. Viral diversity as a challenge to HIV-1 vaccine development. *Curr. Opin. HIV AIDS* **1**, 294–300 (2006).
21. Taylor, B. S., Sobieszczyk, M. E., McCutchan, F. E. & Hammer, S. M. The challenge of HIV-1 subtype diversity. *N. Engl. J. Med.* **358**, 1590 (2008).
22. Tebit, D. M. & Arts, E. J. Tracking a century of global expansion and evolution of HIV to drive understanding and to combat disease. *Lancet. Infect. Dis.* **11**, 45–56 (2011).
23. Junqueira, D. M. & de Matos Almeida, S. E. HIV-1 subtype B: Traces of a pandemic. *Virology* **495**, 173–184 (2016).
24. Vidal, N. *et al.* Unprecedented degree of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Group M genetic diversity in the Democratic Republic of Congo suggests that the HIV-1 pandemic originated in central Africa. *J. Virol.* **74**, 10498–10507 (2000).
25. Pineda-Peña, A. C. *et al.* On the contribution of Angola to the initial spread of HIV-1. *Infect. Genet. Evol.* **46**, 219–222 (2016).
26. Zhu, T. *et al.* An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature* **391**, 594–597 (1998).
27. Gryseels, S. *et al.* A near-full-length HIV-1 genome from 1966 recovered from formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **117**, 12222–12229 (2020).
28. Faria, N. R. *et al.* Distinct rates and patterns of spread of the major HIV-1 subtypes in Central and East Africa. *PLoS Pathog.* **15**, e1007976 (2019).
29. Rodgers, M. A. *et al.* Sensitive next-generation sequencing method reveals deep genetic diversity of HIV-1 in the Democratic Republic of the Congo. *J. Virol.* **91**(6), e01841–16 (2017).
30. Kamangu, E. N. Implication of neighbors in the genetic diversity of the human immunodeficiency virus type 1 in the Democratic Republic of Congo. *ARC J. AIDS* **3**, 26–28 (2018).
31. Peeters, M., Mulanga-Kabeya, C. & Delaporte, E. The genetic diversity of HIV-1. *Virologie* **4**(5), 313–320 (2020).
32. Gaschen, B. *et al.* Diversity considerations in HIV-1 vaccine selection. *Science (80-)* **296**, 2354–2360 (2002).
33. Hemelaar, J. *et al.* Global and regional molecular epidemiology of HIV-1, 1990–2015: a systematic review, global survey, and trend analysis. *Lancet Infect. Dis.* **19**, 143–155 (2019).
34. Yang, C. *et al.* Genetic diversification and recombination of HIV type 1 group M in Kinshasa, Democratic Republic of Congo. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **21**, 661–666 (2005).
35. Yang, C. *et al.* Predominance of HIV type 1 subtype G among commercial sex workers from Kinshasa, Democratic Republic of Congo. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **17**, 361–365 (2001).
36. Gao, F. *et al.* Molecular characterization of a highly divergent HIV type 1 isolate obtained early in the AIDS epidemic from the Democratic Republic of Congo. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **17**(12), 1217–1222 (2001).
37. Kita, K. *et al.* Genetic diversity of HIV type 1 in Likasi, southeast of the Democratic Republic of Congo. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **20**, 1352–1357 (2004).
38. Vidal, N. *et al.* Distribution of HIV-1 variants in the Democratic Republic of Congo suggests increase of subtype C in Kinshasa between 1997 and 2002. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **40**, 456–462 (2005).
39. Vidal, N. *et al.* HIV type 1 pol gene diversity and antiretroviral drug resistance mutations in the Democratic Republic of Congo (DRC). *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **22**, 202–206 (2006).
40. Vidal, N. *et al.* Identification and molecular characterization of subsubtype A4 in Central Africa. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **22**, 182–187 (2006).
41. Vidal, N. *et al.* Characterization of an old complex circulating recombinant form, CRF27\_cpx, originating from the Democratic Republic of Congo (DRC) and circulating in France. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **24**, 315–321 (2008).
42. Vidal, N., Bazepeo, S. E., Mulanga, C., Delaporte, E. & Peeters, M. Genetic characterization of eight full-length HIV type 1 genomes from the Democratic Republic of Congo (DRC) reveal a new subsubtype, A5, in the radiation that predominates in the recombinant structure of CRF26-A5U. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **25**, 823–832 (2009).
43. Niama, F. R. *et al.* CRF45-AKU, a circulating recombinant from central Africa, Is probably the common ancestor of HIV Type 1 MAL and HIV type 1 NOGIL. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **25**, 1345–1353 (2009).
44. Huang, D. D., Foley, B. T., Tolzmann, C. A., Ouma, A. & Bremer, J. W. Complex mosaic composition of near full-length genomes of two NED (NIH-ENVA-DOD) subtype panel HIV type 1 strains, BCF-Dioum and BCF-Kita, originating from the Democratic Republic of Congo (DRC). *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **25**, 1039–1043 (2009).
45. Djoko, C. F. *et al.* High HIV type 1 group M pol diversity and low rate of antiretroviral resistance mutations among the uniformed services in Kinshasa, Democratic Republic of the Congo. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **27**, 323–329 (2011).
46. Muwonga, J. *et al.* Resistance to antiretroviral drugs in treated and drug-naïve patients in the Democratic Republic of Congo. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **57**(Suppl 1), S27–S33 (2011).
47. Kamangu, E. *et al.* Genetic Diversity and Antiretroviral Drug Resistance among Drug-Naïve HIV Type 1 Infected Patients attending Clinics in Kinshasa, Democratic Republic of Congo. *J. HIV AIDS* **1**(1) (2015).
48. Boillot, F. *et al.* Implementation and Operational Research: Programmatic Feasibility of Dried Blood Spots for the Virological Follow-up of Patients on Antiretroviral Treatment in Nord Kivu, Democratic Republic of the Congo. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **71**, e9–e15 (2016).
49. Villabona Arenas, C. *et al.* Divergent HIV-1 strains (CRF92\_C2U and CRF93\_cpx) co-circulating in the Democratic Republic of the Congo: Phylogenetic insights on the early evolutionary history of subtype C. *Virus Evol.* **3**(2), vex032 (2017).
50. Rubio-Garrido, M. *et al.* Utility Of POC Xpert HIV-1 tests for detection-quantification of complex HIV recombinants using dried blood spots from Kinshasa, D. R. Congo. *Sci. Rep.* **9**, 5679 (2019).
51. Kwon, E. H. *et al.* HIV-1 subtypes and drug resistance mutations among female sex workers varied in different cities and regions of the Democratic Republic of Congo. *PLoS ONE* **15**, e0228670 (2020).
52. Potts, K. E. *et al.* Genetic diversity of human immunodeficiency virus type 1 strains in Kinshasa, Zaire. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **9**, 613–618 (1993).
53. Mokili, J. L. K. *et al.* Genetic heterogeneity of HIV type 1 subtypes in Kimpese, rural Democratic Republic of Congo. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **15**, 655–664 (1999).



54. Mokili, J. L. K. *et al.* Identification of a novel clade of human immunodeficiency virus type 1 in Democratic Republic of Congo. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **18**, 817–823 (2002).
55. Triques, K. *et al.* Near-full-length genome sequencing of divergent African HIV type 1 subtype F viruses leads to the identification of a new HIV type 1 subtype designated K. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **16**, 139–151 (2000).
56. Vidal, N., Mulanga-Kabeya, C., Nzilambi, N., Delaporte, E. & Peeters, M. Identification of a complex env subtype E HIV type 1 virus from the Democratic Republic of Congo, recombinant with A, G, H, J, K, and unknown subtypes. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **16**, 2059–2064 (2000).
57. Moradigaravand, D. *et al.* Recombination Accelerates Adaptation on a Large-Scale Empirical Fitness Landscape in HIV-1. *PLoS Genet.* **10**, e1004439 (2014).
58. Kamangu, E., Kabututu, Z., Mvumbi, L., Kalala, L. R. & Mesia, K. Genetic diversity of human immunodeficiency virus type 1 in the Democratic Republic of Congo: A review of available data. *Int. J. Collab. Res. Intern. Med. Public Health* **5**, 295–309 (2013).
59. Olabode, A. S. *et al.* Evidence for a recombinant origin of HIV-1 Group M from genomic variation. *Virus Evol.* **5**, vey039 (2019).
60. Fernández-García, A. *et al.* Identification of a new HIV type 1 circulating BF intersubtype recombinant form (CRF47-BF) in Spain. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **26**, 827–832 (2010).
61. Kamangu, E., Ikolango, B. B. & Ilunga, B. B. Evolution of Subtypes of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Kinshasa over the Last 30 years: Documentary Review from 1985 to 2015. *Mathews J. HIV/AIDS* **2**, 014 (2017).
62. Gartner, M. J., Roche, M., Churchill, M. J., Gorry, P. R. & Flynn, J. K. Understanding the mechanisms driving the spread of subtype C HIV-1. *EBioMedicine* **53**, 102682 (2020).
63. Hassan, A. S., Pybus, O. G., Sanders, E. J., Albert, J. & Esbjörnsson, J. Defining HIV-1 transmission clusters based on sequence data. *AIDS* **31**, 1211–1222 (2017).
64. Van De Vijver, D. A. M. C. & Boucher, C. A. B. Insights on transmission of HIV from phylogenetic analysis to locally optimize HIV prevention strategies. *Curr. Opin. HIV AIDS* **13**, 95–101 (2018).
65. Wertheim, J. O. *et al.* The global transmission network of HIV-1. *J. Infect. Dis.* **209**, 304–313 (2014).
66. Wertheim, J. O. *et al.* Social and Genetic Networks of HIV-1 Transmission in New York City. *PLoS Pathog.* **13**, e1006000 (2017).
67. Kosakovsky Pond, S. L., Weaver, S., Leigh Brown, A. J. & Wertheim, J. O. HIV-TRACE (transmission cluster engine): a tool for large scale molecular epidemiology of HIV-1 and other rapidly evolving pathogens. *Mol. Biol. Evol.* **35**, 1812–1819 (2018).
68. De Mulder, M. & Holguín, A. Utilidad de los dried blood spots para monitorizar la infección por virus de la inmunodeficiencia humana en los programas de salud pública de países en desarrollo. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **31**, 100–107 (2013).
69. Stone, M. *et al.* Comparison of detection limits of fourth- and fifth-generation combination HIV antigen-antibody, p24 antigen, and viral load assays on diverse HIV isolates. *J. Clin. Microbiol.* **6**(8), e02045-17 (2018).
70. Robins, E. B. & Blum, S. Hematologic reference values for African American children and adolescents. *Am. J. Hematol.* **82**, 611–614 (2007).
71. U.S. Food and Drug Administration (FDA). *Investigations Operations Manual 2020*. <https://www.fda.gov/inspections-compliance-enforcement-and-> (2020).
72. World Health Organization (WHO). *WHO Manual for HIV Drug Resistance Testing using Dried Blood Specimens*. [https://www.who.int/hiv/pub/drugresistance/dried\\_blood\\_spots/en/](https://www.who.int/hiv/pub/drugresistance/dried_blood_spots/en/) (2010).
73. National Agency for AIDS Research (ANRS). *ANRS AC11 Resistance Study Group PCR and Sequencing Procedures: HIV-1*. <https://www.hivfrenchresistance.org/ANRS-procedures.pdf> (2015).
74. Stamatakis, A. RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* **30**, 1312–1313 (2014).
75. Price, M. N., Dehal, P. S. & Arkin, A. P. FastTree 2 - Approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS ONE* **5**, e9490 (2010).
76. Martin, D. P. *et al.* RDP3: A flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics* **26**, 2462–2463 (2010).
77. Tamura, K. & Masatoshi, N. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* **10**, 512–526 (1993).

## Acknowledgements

We thank the patients who participated in the study as well as the local professionals responsible for the DBS and data collection of enrolled patients at Monkole and Kalembelembe hospitals in Kinshasa. We also thank Paul Devlin for his proofreading of the manuscript.

## Author contributions

A.H. and G.R. conceived and designed the study. M.R.G, J.M.G, A.H, and J.C.G contributed to data analysis and result discussion. A.H. and S.C. organized in sample shipping. A.N. selected clinical and epidemiological data from patients in DRC and supervised DBS collection and shipping. M.R.G performed the virological analysis of adolescents and paediatric samples and viral sequencing. D.B performed viral amplification and sequencing of adults samples. M.R.G and J.M.G carried out the phylogenetic analysis for variant characterization of the complete study cohort. A.H. and J.C.G supervised phylogenetic analysis. D.B and G.R. performed sequencing and HIV-1 viraemia quantification by Roche assay. A.H, and M.R.G designed final tables and figures and wrote the manuscript. A.N, J.C.G, G.R and S.C revised the paper. All authors approved the final version of manuscript.

## Funding

This study was funded by fundraising activities and donations (mainly of Asociación Bomberos Ayudan), by Instituto de Salud Carlos III through the Projects PI16/01908 and PI18/00904 (Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación 2013–2016 and cofinanced by the European Development Regional Fund “A way to achieve Europe”-FEDER and the Government of Navarre (Grant 045-2015). The study was integrated in the research supported by the Spanish HIV infected Paediatric Cohort (CoRISpe) integrated in the Spanish AIDS Research Network and by Instituto de Salud Carlos III, Spanish Health Ministry (Grant nº RD06/0025-ISCIII-FEDER). This study is also included in the “Subprograma de Inmigración y Salud” from CIBERESP (Spain).

## Competing interests

The authors declare no competing interests.

## Additional information

**Supplementary information** is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74558-z>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to G.R. or Á.H.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020





## PLOS ONE

# High drug resistance levels could compromise the control of HIV infection in paediatric and adolescent population in Kinshasa, the Democratic Republic of Congo

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	PONE-D-20-09317R1
<b>Article Type:</b>	Research Article
<b>Full Title:</b>	High drug resistance levels could compromise the control of HIV infection in paediatric and adolescent population in Kinshasa, the Democratic Republic of Congo
<b>Short Title:</b>	Resistance to antiretroviral drugs of children and adolescents from Kinshasa
<b>Corresponding Author:</b>	Africa Holguin Hospital Universitario Ramon y Cajal Madrid, -- State SPAIN
<b>Keywords:</b>	HIV resistance, children and adolescents, treatment, virological failure, Democratic Republic of Congo.
<b>Abstract:</b>	<p><b>Background:</b> The inadequacy of HIV viraemia and resistance monitoring in Africa leads to uncontrolled circulation of HIV strains with drug resistance mutations (DRM), compromising antiretroviral therapy (ART) effectiveness. This study describes the DRM prevalence and its therapeutic impact in HIV-infected pediatric patients from Kinshasa (Democratic Republic of Congo, DRC).</p> <p><b>Methods:</b> From 2016-2018, dried blood were collected from 71 HIV-infected children and adolescents under ART in two hospitals in Kinshasa for HIV-1 DRM pol analysis, predicted ARV-susceptibility by Stanford and phylogenetic characterization.</p> <p><b>Results:</b> HIV-1 sequences were recovered from 55 children/adolescents with 14 years of median-age. All had received nucleoside and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTI, NNRTI), 9.1% protease inhibitors (PI) and only one integrase inhibitor (INI). Despite the use of ART, 89.1% showed virological failure and 67.3% carried viruses with major-DRM to one (12.7%), two (47.3%), or three (5.5%) ARV-families. Most children/adolescents harbored DRM to NNRTI (73.5%) or NRTI (61.2%). Major-DRM to PI was present in 8.3% and minor-DRM to INI in 15%. Dual-class-NRTI+NNRTI resistance appeared in 53.1% of patients. Viruses presented high/intermediate resistance to nevirapine (72.9% patients), efavirenz (70.9%), emtricitabine/lamivudine (47.9%), rilpivirine (41.7%), etravirine (39.6%), doravudine (33.3%), zidovudine (22.9%), among others. Most participants were susceptible to INI and PI. Great diversity of variants was found, with a high rate (40%) of unique recombinants.</p> <p><b>Conclusion:</b> The high DRM prevalence observed among HIV-infected children and adolescents in Kinshasa could compromise the 95-95-95-UNAIDS targets in the DRC. It also reinforces the need for routine resistance monitoring for optimal rescue therapy election in this vulnerable population to control the spread of resistant HIV in the country.</p>
<b>Order of Authors:</b>	Marina Rubio-Garrido Gabriel Reina Adolphe Ndarabu Ana Rodriguez-Galet Ana Valadés-Alcaraz David Barquín Silvia Carlos Africa Holguin
<b>Opposed Reviewers:</b>	
<b>Response to Reviewers:</b>	REVIEWER 1 Overall comments:

PONE-D-20-09317-R1

1 ***High drug resistance levels could compromise the control of HIV***  
2 ***infection in paediatric and adolescent population in Kinshasa,***  
3 ***the Democratic Republic of Congo***

4

5 **Short title:** Resistance to antiretroviral drugs of children and adolescents from  
6 Kinshasa.

7

8 Marina Rubio-Garrido<sup>1</sup>, Gabriel Reina<sup>2</sup>, Adolphe Ndarabu<sup>3</sup>, Ana Rodriguez-Galet<sup>1</sup>, Ana  
9 Valadés-Alcaraz<sup>1</sup>, David Barquín<sup>2</sup>, Silvia Carlos<sup>4</sup> and África Holguín<sup>1\*</sup>

10

11 <sup>1</sup>HIV-1 Molecular Epidemiology Laboratory, Microbiology and Parasitology Department, Hospital Ramón  
12 y Cajal-IRYCIS and CIBERESP-RITIP-CoRISPe, Madrid (28034), Spain.

13 <sup>2</sup>Microbiology Department, Clínica Universidad de Navarra. Navarra Institute for Health Research. Institute  
14 of Tropical Health, Universidad de Navarra (Pamplona, Spain).

15 <sup>3</sup>Monkole Hospital (Kinshasa, Democratic Republic of Congo).

16 <sup>4</sup> Department of Preventive Medicine and Public Health, Universidad de Navarra. Navarra Institute for  
17 Health Research. Institute of Tropical Health, Universidad de Navarra (Pamplona, Spain).

18

19 \*Corresponding author:

20 África Holguín

21 HIV-1 Molecular Epidemiology Laboratory

22 IRYCIS- Ramón y Cajal University Hospital-and CIBERESP-RITIP

23 Crt. Colmenar Viejo, Km 9,100, 28034 Madrid, Spain

24 E-mail: [afrika.holguin@salud.madrid.org](mailto:afrika.holguin@salud.madrid.org)

25 Phone: +34-913368153

26 ORCID: [0000-0002-1330-8050](https://orcid.org/0000-0002-1330-8050)

## PONE-D-20-09317-R1

27 **ABSTRACT**

28 **Background:** The inadequacy of HIV viraemia and resistance monitoring in Africa leads  
29 to uncontrolled circulation of HIV strains with drug resistance mutations (DRM),  
30 compromising antiretroviral therapy (ART) effectiveness. This study describes the DRM  
31 prevalence and its therapeutic impact in HIV-infected pediatric patients from Kinshasa  
32 (Democratic Republic of Congo, DRC).

33 **Methods:** From 2016-2018, dried blood were collected from 71 HIV-infected children  
34 and adolescents under ART in two hospitals in Kinshasa for HIV-1 DRM *pol* analysis,  
35 predicted ARV-susceptibility by Stanford and phylogenetic characterization.

36 **Results:** HIV-1 sequences were recovered from 55 children/adolescents with 14 years of  
37 median-age. All had received nucleoside and non-nucleoside reverse transcriptase  
38 inhibitors (NRTI, NNRTI), 9.1% protease inhibitors (PI) and only one integrase inhibitor  
39 (INI). Despite the use of ART, 89.1% showed virological failure and 67.3% carried viruses  
40 with major-DRM to one (12.7%), two (47.3%), or three (5.5%) ARV-families. Most  
41 children/adolescents harbored DRM to NNRTI (73.5%) or NRTI (61.2%). Major-DRM to  
42 PI was present in 8.3% and minor-DRM to INI in 15%. Dual-class-NRTI+NNRTI resistance  
43 appeared in 53.1% of patients. Viruses presented high/intermediate resistance to  
44 nevirapine (72.9% patients), efavirenz (70.9%), emtricitabine/lamivudine (47.9%),  
45 rilpivirine (41.7%), etravirine (39.6%), doravirine (33.3%), zidovudine (22.9%), among  
46 others. Most participants were susceptible to INI and PI. Great diversity of variants was  
47 found, with a high rate (40%) of unique recombinants.

48 **Conclusion:** The high DRM prevalence observed among HIV-infected children and  
49 adolescents in Kinshasa could compromise the 95-95-95-UNAIDS targets in the DRC. It  
50 also reinforces the need for routine resistance monitoring for optimal rescue therapy  
51 election in this vulnerable population to control the spread of resistant HIV in the  
52 country.

53 **Key words:** HIV resistance, children and adolescents, treatment, virological failure,  
54 Democratic Republic of Congo.



## PONE-D-20-09317-R1

78 provided as a first-line regimen, regardless of the presence of HIVDR or prior exposure  
79 to ARV. Besides, the significant loss in susceptibility of the nucleoside reverse  
80 transcriptase inhibitors (NRTI) class is of particular concern for young children, for whom  
81 the number of licensed NRTIs is limited(3). Therefore, the emergence of HIVDR  
82 threatens the improvements in morbidity and mortality anticipated by a “treat all”  
83 approach and even the scale-up of pre-exposure prophylaxis(8).

84 Nearly 1.7 million children, 1.6 million adolescents, and 3.5 million young people are  
85 currently infected with HIV-1 worldwide, 90% living in Sub-Saharan Africa (9).  
86 Adolescents are highly vulnerable to HIV infection, mainly those living in settings with a  
87 generalized HIV epidemic(10). The WHO estimates that one-seventh of all new HIV  
88 infections occur during adolescence(11). ART has strikingly reduced morbidity and  
89 mortality in children and adolescents. However, suboptimal virological suppression  
90 fosters the emergence of viruses carrying HIV drug resistance mutations (DRM), with  
91 important consequences for children and adolescents as they require ART for longer  
92 periods than adults(12). HIV-infected children are at high risk of acquiring drug-resistant  
93 viruses, which is of particular concern in settings where ARV drug options are limited.  
94 High levels of acquired drug resistance after the first treatment reduce the virus’  
95 susceptibility to ARVs and jeopardize the recycling of ARVs in second-line ART(3).

96 In the Democratic Republic of Congo (DRC), the coverage of people living with HIV  
97 receiving ART was 57% in 2018, but only 25% among children(9), although more than  
98 100,000 children and adolescents are HIV-infected in the DRC. Furthermore, viraemia  
99 and HIVDR monitoring for ART optimization are absent during the clinical routine in all  
100 HIV-infected subjects. It can lead to late treatment failures identification due to resistant

## PONE-D-20-09317-R1

101 viruses, to empirical switches of ART regimens with recycled NRTIs, and to resistant  
102 viruses spreading. Without correct HIV monitoring, patients may spend months or even  
103 years on a failing ARV regimen, resulting in DRM accumulation and increased rates of  
104 morbidity and mortality(13–16). Accordingly, the Joint United Nations Program on  
105 HIV/AIDS (UNAIDS) and the WHO reinforced the importance of HIVDR monitoring to  
106 control the HIV epidemic(3,4,17), mainly in key populations such as infants and  
107 adolescents.

108 For all these reasons, the aim of this study is to analyze HIVDR prevalence and its  
109 therapeutical impact on the children and adolescent population from Kinshasa (DRC).  
110 To find out the current situation of these populations in the DRC is particularly important  
111 due to their lifelong-treatment with more years under ART than adults.

PONE-D-20-09317-R1

**112 METHODS****113 Samples collection**

114 Dried blood specimens (DBS) from HIV-infected children and adolescents under clinical  
115 follow-up in paediatric units at Monkole and Kalembelembe Hospitals in Kinshasa (DRC)  
116 were collected in 2016-2018. DBS samples were prepared by spotting 70 µl of venous  
117 blood collected by venipuncture in EDTA-anticoagulant tubes into each dot on a  
118 Whatman 903 Protein Saver Card (Schleicher&Schuell, Dassel, Germany). They were  
119 dried separately overnight at room temperature, sealed in a zip-lock bag with desiccant,  
120 and stored at -20 °C until transported in dry ice to the HIV-1 Molecular Epidemiology  
121 Laboratory in Madrid, Spain, where samples were stored at -80 °C until further analysis.

**122 Resistance analysis**

123 RNA was extracted from two DBS dots using the NucliSENS EasyMag automated  
124 platform (BioMerieux) following elution with lysis buffer (EasyMag). Viral RNA was  
125 amplified in the HIV-1 *pol* coding region by RT-PCR and nested-PCR using primers  
126 designed by WHO(18) for protease (PR) and reverse transcriptase (RT) regions, as  
127 previously described(19). We used ANRS primers(20) for viral integrase (IN)  
128 amplification. Viral sequences included the complete HIV-1 PR (codons 1–99), partial RT  
129 (1–335), and IN (1–285). PCR amplicons were purified using the Illustra™ ExoProStar 1-  
130 Step™ (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK) and sequenced by Macrogen Inc.  
131 (Gasan-dong, Geumchun-gu, Seoul, Korea). Sequences were assembled and manually  
132 edited using Lasergene software. DRM in pretreated children/adolescents to PR  
133 inhibitors (PI), NRTI, NNRTI, and integrase inhibitors (INI) were characterized by Stanford

## PONE-D-20-09317-R1

134 HIVdb Program v8.8 (Stanford University, Palo Alto, CA, USA) as well as predicted  
135 resistance level to each ARV.

**136 Statistics analysis**

137 Descriptive statistical analysis was performed calculating mean, median, and  
138 interquartile range (IQR). The percentage of virus carrying DRM was calculated with 95%  
139 confidence intervals (CI). The statistical significance was calculated using a T-Student or  
140 Mann–Whitney U tests. P-values <0.05 were considered statistically significant.  
141 Statistical analyses were conducted using GraphPad Prism version 8.0.1 (San Diego, CA,  
142 USA).

**143 HIV-1 variant characterization**

144 Nucleotide sequences were translated and aligned using the ClustalW algorithm  
145 implemented in MEGA6. For HIV-1 variant characterization we used reference  
146 sequences available in Los Alamos HIV Sequence Database (<http://www.hiv.lanl.gov>).  
147 Phylogenetic trees (PhyML tree) were reconstructed by maximum-likelihood (ML)  
148 method(21) using the general time reversible plus proportion of invariable sites plus  
149 gamma distribution parameter (GTR+I+G) evolutionary model. For estimating the  
150 bootstrap values on the inferred PhyML tree topology, Shimodaira-Hasegawa test using  
151 FastTree program was used (support >90%)(22). Sequences not clustering with any  
152 known subtype or circulating recombinant form (CRF) were analyzed using  
153 Recombination Detection Program (RDP3v4.13)(23), identifying the subtypes involved  
154 in eventual recombination events and hypothetical recombination breakpoints. To  
155 further confirm the detected putative recombination events, new phylogenetic analyses  
156 were performed using the sequence fragments assigned to different subtypes according

## PONE-D-20-09317-R1

157 to the proposed breakpoint position(s) defined by RPD3. In the positive cases, the  
158 recombinant sequences were redefined as unique recombinant forms (URFs). The  
159 remaining cases were denoted as unique unclassified (U) variants.

160 **Accession numbers**

161 HIV-1 sequences were submitted to GenBank with the following accession numbers:  
162 MH920378-MH920389, MN530990-MN530996, MN531052-MN531082 and  
163 MN998519-MN998523.

164 **Ethical aspects**

165 The project was approved by the Human Subjects Review Committees at Monkole  
166 Hospital/University of Kinshasa (DRC) and University Hospital Ramón y Cajal (Madrid,  
167 Spain). Informed consent was obtained from parents or guardians of enrolled  
168 participants. Children and adolescents also provided assent after parental consent when  
169 they could understand the meaning of participation in the study. All methods were  
170 carried out according to relevant guidelines and regulations.



PONE-D-20-09317-R1

171 **RESULTS**172 **Study population**

173 DBS samples were collected between 2016 and 2018 from 71 HIV-positive subjects (34  
 174 children, 37 adolescents) under HIV care and ART in paediatric units of Monkole and  
 175 Kalembelembe Hospitals. Among them, 85.5% of children/adolescents presented  
 176 viraemia higher than 1,000cp/ml at sampling. HIV-1 sequences could be recovered from  
 177 55 (77.5%) patients in, at least, one genotype region for DRM analysis. (**Table 1**).

178 **Table 1** describes the main features of the study population. The median age at  
 179 diagnosis/first ART of the 55 subjects with a sequence was 6 [IQR:2-12]/7 [IQR:3.5-12]  
 180 years. The median age at study enrolment was 14 [IQR: 11-16] years. All of them were  
 181 under ART at sampling and had received NRTI and NNRTI, 9.1% were PI-experienced,  
 182 and only one adolescent (1.8%) had received INI.

183 The 55 participants with available viral sequence were under 1<sup>st</sup> (34.5%), 2<sup>nd</sup> (30.9%) or  
 184 3<sup>rd</sup> ART regimen (23.6%) at sampling, and 6 (10.9%) had received 4, 5 or 7 different ARV  
 185 regimens. The most common regimen was zidovudine/lamivudine with nevirapine  
 186 (81.8%) or efavirenz (16.4%), followed by tenofovir/lamivudine/efavirenz (63.6%). All  
 187 subjects were lamivudine-experienced, followed by zidovudine (85.5%), nevirapine  
 188 (83.6%), tenofovir (65.5%), and efavirenz (65.5%).

189 Although children and adolescents had both been under ART exposure for 6 years [IQR:  
 190 1-8.5], the number of children under 1<sup>st</sup> ARV regimen was significantly higher than in  
 191 adolescents ( $p<0.05$ ). Moreover, 89.1% of the 55 children/adolescents under study  
 192 presented virological failure at sampling. The 55 samples showed median viral load of  
 193 11,824cp/ml [IQR: 2,950–59,578].

## PONE-D-20-09317-R1

Moreover, adolescents presented a significantly higher delay in HIV diagnosis than children (10.5 vs. 4 years) and 1<sup>st</sup> ART (12 vs. 4 years). Besides, adolescents showed higher exposure to several drugs than children, including tenofovir, stavudine and efavirenz (Table 1). Regarding HIV-1 variants, 52.8% children/adolescents carried pure subtypes at *pol* (13A, 1A2, 1B, 3C, 1D, 1F1, 6G, 2H, 1J) and 43.6% recombinants, being mainly URF (40%). CRF included 1 CRF27\_cpx and 1 CRF47\_BF. The remaining variants were unclassified (U) variants (Table 1).

**Table 1. Demographic and virological characteristics of children and adolescents of the study cohort with available HIV sequence.**

	Children [0-14] (%)	Adolescents [15-21] (%)	P value	Total cohort (%)
Total available sequences	27 (100)	28 (100)		55 (100)
Female	12 (44.4)	17 (60.7)		29 (52.7)
<b>Median age (years)</b>				
At HIV diagnosis in the DRC [IQR]	4 [1-8]	10.5 [5.3-13]	**	6 [2-12]
At first ART experience [IQR]	4 [0.8-8]	12 [7-13]	**	7 [3.5-12]
At DBS collection [IQR]	11 [9-12]	16 [15-17]	**	14 [11-16]
<b>HIV status in mothers</b>				
HIV+	12 (44.4)	7 (25)		19 (34.6)
HIV-	2 (7.4)	5 (17.9)		7 (12.7)
unknown	13 (48.2)	16 (57.1)		29 (52.7)
<b>HIV-1 viraemia</b>				
>1,000c/ml by Roche VL	25 (92.6)	24 (85.7)		49 (89.1)
<b>ART exposure at sampling</b>				
ART	27 (100)	28 (100)		55 (100)
Median time under ART [IQR]	6 [1-8]	6 [1.3-10]		6 [1-8.5]
<b>Mean ARV exposure time (years)</b>				
To NRTI	5.2 (0-12.2)	6.2 (0-13.3)		5.8 (0-13.3)
To NNRTI	4.6 (0-11.2)	6.2 (0-13.3)		5.4 (0-13.3)
To PI	0.9 (0-12.2)	0.26 (0-3.4)		0.6 (0-12.2)
To INI	0	0.09 (0-2.7)		0.05 (0-2.7)
<b>Number of different ART regimens until sampling</b>				
1	13 (48.1)	6 (21.4)	*	19 (34.5)
2	7 (25.9)	10 (35.7)		17 (30.9)
3	5 (18.5)	8 (28.6)		13 (23.6)
4	1 (3.7)	1 (3.6)		2 (3.6)
5	1 (3.7)	2 (7.1)		3 (5.5)
7	0	1 (3.6)		1 (1.8)
<b>NRTI experience</b>				
3TC	27 (100)	28 (100)		55 (100)
AZT	21 (77.8)	26 (92.9)		47 (85.5)
TDF	13 (48.1)	23 (82.1)	*	36 (65.5)
DDI	1 (3.7)	0		1 (1.8)
ABC	5 (18.5)	2 (7.1)		7 (12.7)

## PONE-D-20-09317-R1

	D4T	0	4 (14.3)	*	4 (7.3)
<b>NNRTI experience</b>					
	NVP	21 (77.8)	25 (89.3)		46 (83.6)
	EFV	13 (48.1)	23 (82.1)	*	36 (65.5)
<b>PI experience</b>					
	LPV/r	3 (11.1)	2 (7.1)		5 (9.1)
<b>INI experience</b>					
	DTG	0	1 (3.4)		1 (1.8)
<b>HIV+ subjects with available <i>pol</i> HIV-1 sequences</b>					
	PR	18 (66.7)	18 (64.3)		36 (65.5)
	RT	23 (85.2)	26 (92.9)		49 (89.1)
	INT	22 (81.5)	18 (64.3)		40 (72.7)
<b>HIV-1 variants</b>					
	<b>Non-B pure subtypes</b>	15 (55.6)	14 (50)		29 (52.8)
	CRF	1 (3.7)	1 (3.6)		2 (3.6)
	URF	9 (33.3)	13 (46.4)		22 (40)
	U	2 (7.4)	0		2 (3.6)

**Legend Table 1.** Data according to clinical reports. DRC, the Democratic Republic of Congo; DBS, dried blood Spot; ART, antiretroviral treatment; NRTI, nucleoside transcriptase reverse inhibitor; NNRTI, non-NRTI; PI, Protease inhibitor; INI, integrase inhibitors; IQR; *interquartile range*; c/ml, copies of HIV-1 RNA per milliliter; VL, viral load; ART, antiretroviral therapy; ARV, antiretroviral drug; 3TC, lamivudine; AZT, Zidovudine; TDF, Tenofovir; DDI, Didanosine; ABC, Abacavir; D4T, Stavudine; NVP, Nevirapine; EFV, Efavirez; LPV/r, Lopinavir/Ritonavir; DTG, Dolutegravir; PR, protease; RT, reverse transcriptase; IN, integrase; CRF, circular recombinants forms; URF, unique recombinants forms; U, unknown. \*\*,  $p < 0.001$ ; \*,  $p < 0.05$ . Viral load quantified by Roche Cobas v2.0, Limit of quantification <20cp/ml. Corrected cp/ml plasma considering hematocrit(24)

### HIVDR among children and adolescents on ART

**Fig 1** shows the drug resistance mutations to the main ARV families found in the study cohort. Among the 55 children and adolescents with available *pol* sequences, 37 (67.3%) were infected with viruses carrying major-DRM to one (12.7%), two (47.3%) or three (5.5%) ARV families, without significant differences among children and adolescents' groups. Only a third (32.7%) of the treated study cohort did not present major-DRM at sampling, despite having virological failure with no suppressed viral load in 88.2% of them. When also considering minor-DRM to PI and INI, 38 (69.1%) were infected with viruses carrying DRM to one (12.7%), two (43.6%), three (10.9%), or four (1.8%) ARV families (**Fig 1** and **S1 Table**).

## PONE-D-20-09317-R1

**Legend Fig 1.** Mean DRM prevalence (colored dots) and 95% confidence intervals on the study cohort with available sequence by age. Single resistance, to one ARV family; double, triple, or quadruple resistance and total DRM ARV families. DRM to PI are always major unless otherwise indicated. DRM to INI are always minor. ARV, antiretroviral drugs; NRTI, nucleoside transcriptase reverse inhibitor; NNRTI, non-nucleoside transcriptase reverse inhibitor; PI, Protease inhibitor; INI, integrase inhibitors. Rates calculated considering available sequences (55) reported in **Table 1**. More data available in **S1 Table**.

Of the 36/49/40 successfully sequenced samples at PR/RT/IN, DRM to NNRTI were present in 73.5% [95% CI, 59.7-83.8], DRM to NRTI in 61.2% [95% CI, 47.2-73.6], major-DRM to PI in 8.3% [95% CI, 2.8-21.8] and minor-DRM to INI in 15% [95% CI, 7.1%-29.1]. Dual-class NRTI+NNRTI resistance was present in 44.9% [95% CI, 31.9-58.7] children/adolescents (**S1 Table**). All viruses harboring DRM to NRTI also contained DRM to NNRTI. Only one 15.5 years old adolescent with 13.3 years of ART experience carried viruses with resistance to the 4 drug families, although with minor DRM to INI.

**Fig 2** and **S2 Table** show the DRM found in the study population. DRM present in 61.2% of children/adolescents were to NRTI, M184V (44.9%), K70R/N and T215Y/F (14.3% each), M41L/L210W (12.2% each). DRM to NNRTI were presented in 73.5% of population: K103N/H/S (42.9%), Y181C/G190A (24.5% each), V108I/K101E/H (18.4% each) and H221Y/V106I (12.2% each). The three subjects with major DRM to PI carried M46I (8.3%) and two also had I54V, only one of them had previous experience to PI. Minor DRM to INI were found in 15% of subjects with available IN sequences, 9.1% children, and 22.2% adolescents. When comparing the rate of infections with resistant viruses carrying major DRM in children (0-14 years) vs. adolescents (15-21 years) under study, no significant difference was observed (**S1 Table**).



## PONE-D-20-09317-R1

248 **Legend Fig 2.** DRM, drug resistance mutation; NRTI, nucleoside transcriptase reverse  
249 inhibitor; NNRTI, non-NRTI; PI, Protease inhibitor; INI, integrase inhibitor. Available  
250 sequences in 55 children/adolescents under study: 38PR, 49RT, and 40IN. More data  
251 available in **S2 Table**.

252

253 Infections with resistant viruses were associated with ART exposure time. DRMs to all  
254 ARV families were higher in those patients having been under ART for more than 5 years  
255 (**Fig 3A**). The rate of children and adolescents carrying viruses resistant to NRTI was 2  
256 times higher in those having been under ART for more than 5 years (OR=3.75; 95% CI  
257 [1.22-11.34],  $p<0.05$ ) (**Fig 3A**). **Fig 3B** shows the steadily tend to increase of infections  
258 with resistant viruses with ART exposure time.

259 **Legend Fig 3.** ART, antiretroviral therapy; DRM; drug resistance mutation; NRTI,  
260 nucleoside reverse transcriptase inhibitor; NNRTI, non-nucleoside reverse transcriptase  
261 inhibitor; PI, protease inhibitor; INI, integrase inhibitor; n, number of patient. In 2 of the  
262 55 subjects time under ART was unknown.

263

264 **Predicted ARV susceptibility.**

265 Most children and adolescents with available *pol* genotype were infected with viruses  
266 susceptible to PI (88.9%) and INI (87.5%). A high resistance level was observed in 70.8%  
267 subjects to nevirapine, in 64.6% to efavirenz, in 45.8% to emtricitabine, or lamivudine,  
268 37.5% to rilpivirine, and at lower rates for other ARV, except for INI (**Fig 4** and **S1 Fig**).

269 When considering both high or intermediate resistance level to NNRTIs, most (72.9%  
270 and 70.9%) subjects presented high and intermediate resistance to nevirapine and  
271 efavirenz, respectively, and 41.7% to rilpivirine, 39.6% to etravirine, and 33.3% to

PONE-D-20-09317-R1

272 doravidine. For NRTI, half (47.9%) of the subjects carried viruses with high and  
273 intermediate resistance to lamivudine and emtricitabine, 22.9% to zidovudine, 18.8% to  
274 abacavir, and 14.6% to tenofovir. For PI, these rates were lower than 10% and absent  
275 for INI (**Fig 4 and S1 Fig**).

276 **Legend Fig 4.** Predicted ARV susceptibility in 38PR/49RT/40IN available sequences from  
277 55 children/adolescents under study. NRTI, nucleoside reverse transcriptase inhibitor;  
278 NNRTI, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor; PI, protease inhibitor; INI,  
279 integrase inhibitor; ATV/r, Atazanavir/Ritonavir; DRV, Darunavir; FPV, Fosamprenavir;  
280 IDV/r, Indinavir/Ritonavir; LVP/r, Lopinavir/Ritonavir; NFV, Nelfinavir; SQW, Saquinavir;  
281 TPV/r Tipranavir/Ritonavir; ABC, Abacavir; AZT, Zidobudine; D4T, Estavudine; DDI,  
282 Didanosine; FCT, Emtricitabine; 3TC, Lamivudine; TDF, Tenofovir; DOR: Doravirine; EFV,  
283 Enfavirez; ERT, Etravirine; NVP, Nevirapine; RPV, Rilpivirine; DGT, Dolutegravir; EVG,  
284 Elvitegravir; RAL, Raltegravir. Information per patient in **S1 Fig**.

PONE-D-20-09317-R1

285 **DISCUSSION**

286 This study represents the first characterization of HIV drug resistance among HIV-  
287 infected children and adolescents in the DRC. Moreover, it provides the most recent  
288 data of resistance to ARV drugs in Kinshasa and the DRC. While all published studies  
289 from DRC reported resistance data in naïve(25–28)or treated adults(25,29) with samples  
290 collected from 2002 to 2014, our study had analyzed samples collected from 2016-2018.  
291 In addition, the present study is the first reporting resistance data for INI in that country,  
292 which is appropriate before the expected broad implementation of dolutegravir  
293 implementation in the DRC.

294 In the DRC and other Sub-Saharan Africa countries, HIV monitoring is limited due to a  
295 weak Public Health System and administration. Molecular diagnosis and VL testing are  
296 poorly accessible, mainly centralized in a national laboratory or restricted to some  
297 specific private hospitals. Moreover, resistance monitoring is not routinely available in  
298 the DRC(30). For these reasons, ART regimen changes are determined by ARV  
299 availability, sometimes restricted by stock-outs(31), toxicity, and secondary effects in  
300 patients. No antiretroviral stock out was reported in Monkole and Kalembelembe  
301 hospitals during the study period.

302 According to the published data in samples from ART-naïve adults collected from 2002-  
303 2014 in DRC, the reported pre-antiretroviral-treatment drug resistance (PDR), a  
304 predictor of treatment failure, ranged from 0%-2.4% to PI, from 0-18.3% to NRTI, and  
305 from 0-9.8% to NNRTI, and unknown for INI(25–28). Our study in children and  
306 adolescents from Kinshasa revealed that 7 out of 10 participants with available  
307 sequences harbored DRM, 4 out of 10 double resistance to NRTI+NNRTI, and 1 in 10

## PONE-D-20-09317-R1

308 triple resistance to NRTI+NNRTI+PI. Of note, 7 out of 10 subjects with DRM to NNRTI had  
309 intermediate or high-level resistance to efavirenz and nevirapine, ARVs involved in first-  
310 line ART in the DRC. The observed burden of major DRM to PI in treated pediatric  
311 population was substantially higher than that previously reported in HIV-infected  
312 treated adults in the country(25,26,29). Although adherence was promoted by medical  
313 staff, as well as in group of support with peers, accordingly to local staff, a third of 55  
314 ART-treated children and adolescents with available sequence presented unsuppressed  
315 viraemia in the absence of resistant viruses. It would suggest that adherence support is  
316 required in this pediatric collective(3).

317 Since 2013, the WHO has recommended using PI-based ART regimens for children. In  
318 2018, the WHO formally encouraged the phase-out of NNRTIs across age groups, with  
319 the introduction of dolutegravir for children with approved dose. However, in 2017,  
320 globally nearly 77% of children were still receiving nevirapine in first-line ART due to  
321 limited supplies of child-friendly drug formulations(3,32). Previous national guidelines  
322 from ART in the DRC recommended tenofovir + lamivudine + efavirenz as the first-line  
323 regimen for infected adolescents and adults, tenofovir + lamivudine + ritonavir-boosted  
324 lopinavir for second-line, and abacavir + dolutegravir + ritonavir-boosted darunavir for  
325 the third-line ART. In infants, guidelines recommended abacavir + lamivudine + ritonavir-  
326 boosted lopinavir or efavirenz. Dolutegravir, included in 2019 in the first-line ART  
327 therapy in children, adolescents and adults on the DRC will probably improve viral load  
328 suppression, and it is expected to reduce mortality and HIV incidence compared to EFV-  
329 based regimens(3). However, it is important to monitor their implementation and to  
330 forecast the development of DRM(33). INI treatment would therefore be a good  
331 alternative to NNRTIs due to the high presence of DRM to this ARV family, as we



## PONE-D-20-09317-R1

332 observed in our study. Moreover, the absence of major DRM to INI in the study  
333 population (never exposed to this drug family, except in one case), would strongly  
334 support the implementation of new dolutegravir-based treatment in the DRC. However,  
335 the circulation of viruses with minor DRM to INI residues (observed in 15% of  
336 children/adolescents) could affect INI susceptibility in combination with other  
337 substitutions(34). If the presence of M184I/V or K65R (DRM to NRTI) could prevent  
338 dolutegravir resistance as previously suggested(35) , it should be explored further. As  
339 expected, the great diversity of HIV-1 variants in the country(36) is reflected in our study  
340 cohort, with a high rate of URF.

341 A limitation of this study is that samples were collected for ART treated subjects in two  
342 hospitals in Kinshasa, and it could not be representative of the situation on a city or  
343 country-wide level. However, Monkole and Kalembelembe hospitals are considered in  
344 the top 5 of clinical centers with more HIV-infected children and adolescents under ART  
345 in Kinshasa. Further analyses are required to monitor the current transmission of drug-  
346 resistant strains in ART-naïve HIV-infected children and adolescents in the DRC.

347 The sample size, although modest, was similar to other related resistance studies among  
348 treated patients in the DRC, analyzing from 55(29) to 93(25) *pol* sequences.  
349 Furthermore, the presented data are the first resistance information available for  
350 children and adolescents under ART in the country. Previous reports showed that HIVDR  
351 in naïve adults was very low in the DRC before the year 2007(26,27), although some TDR  
352 in some RT residues reached prevalence higher than 10% in samples collected in  
353 Kinshasa during 2013-2014(28). Understanding levels of DRM prior to treatment  
354 initiation is particularly important in children because they have higher viraemias and

PONE-D-20-09317-R1

355 faster disease progression compared to adults(37). However, it would be necessary to  
356 know the TDR rate in ART-naïve children and adolescents in the city and country.  
357 Unfortunately, we cannot estimate the rate of resistant viruses which could have been  
358 transmitted at first HIV infection in our study cohort. The third limitation was the lack of  
359 complete information regarding HIV-status, treatment, and resistance data from all their  
360 mothers, which could have identified cases of vertical DRM transmission. The last  
361 limitation would be the absence of resistance data in 16 ART-treated participants with  
362 negative *pol* amplifications. It could be explained by the low viraemias reported in some  
363 of them due to ART control. Moreover, we cannot exclude that some negative PCR could  
364 be due to the high viral genetic variability in viral targets for primers used for *pol*  
365 amplification. A recent study reported the temporal trends of HIV-1 subtypes and  
366 recombinants in the DRC during a 43-year period (1976-2018) and in Kinshasa from 1983  
367 to 2018, showing a high number of different HIV-1 variants currently circulating in that  
368 city, with an increase of complex and unique recombinants in the last years(38).

369 Multiple studies have demonstrated that the percentage of patients with drug  
370 resistance goes up steadily as time on treatment increases(25,39), as we have observed  
371 in the current study. Since children and adolescents are patients with a lifelong-  
372 treatment with more years under ART than adults, the study of DRM is particularly  
373 important in pediatric populations.

374 Thus, all generated results were communicated to clinicians in Kinshasa for better care  
375 of pediatric patients under study, providing useful data for ART regimen optimization.  
376 This work provides unique information related to these vulnerable populations in  
377 Kinshasa and in the rest of the country, where nearly 3 million children and adolescents

## PONE-D-20-09317-R1

378 are HIV infected without VL and resistance monitoring. We also reinforced the use of  
379 DBS as field-friendly and an useful specimen to carry out resistance analysis in low-  
380 middle income countries as the WHO recommends in the absence of plasma(3).

381 DRM monitoring is also crucial to control infection in these countries, where most  
382 paediatric HIV occur. Also, it is important to reinforce adherence support, and to  
383 implement routine VL quantification and resistance testing in the DRC national  
384 guidelines, strengthening the country's laboratory services. Our findings also support  
385 alternative ART regimens based on PI and INI instead of RTI in HIV-infected children and  
386 adolescent population in that country. These improvements would help to control the  
387 spread of resistant viruses among new HIV infections, getting the DRC closer to WHO's  
388 95-95-95 targets(40).

389

390 **FUNDING STATEMENT:**

391 This study was funded by fundraising activities and donations (mainly from Bomberos  
392 Ayudan Association), and by Instituto de Salud Carlos III through the Projects PI16/01908  
393 and PI18/00904" (Co-funded by European Regional Development Fund "A way to make  
394 Europe"/"Investing in your future") and the Government of Navarra (grant 045-2015).

395

396 **ACKNOWLEDGMENTS:**

397 We thank the children/adolescents who participated in the study as well as the local  
398 professionals responsible for the DBS and data collection of enrolled patients at  
399 Monkole and Kalembelembe hospitals in Kinshasa. We also thank Paul Devlin for his  
400 proofreading of the manuscript. We thank José María López-Pintor for his technical

**PONE-D-20-09317-R1**

401 support during the lab processing of some DBS samples. We thank Samclide Mbikayi and  
402 Beni Makonda for their clinical support and help in updating the clinical data of the  
403 participants. The study was integrated in the research supported by the Spanish HIV  
404 infected Paediatric Cohort (CoRISpe) integrated in the Spanish AIDS Research Network  
405 and by the Instituto de Salud Carlos III, Spanish Health Ministry (Grant no. RD06/0025-  
406 ISCIII FEDER). This study is also included in the "Subprograma de Inmigración y Salud"  
407 from CIBERESP (Spain) and in Red de Investigación Translacional en  
408 Infectología Pediátrica (RITIP)."

409

410 **CONFLICTS OF INTEREST:**

411 The authors have no conflicts of interest or funding to disclose.

## PONE-D-20-09317-R1

## REFERENCES

1. United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). How AIDS changed everything. [Internet]. 2015. Available from: [https://www.unaids.org/sites/default/files/media\\_asset/MDG6Report\\_en.pdf](https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/MDG6Report_en.pdf)
2. World Health Organization (WHO). Global report on early warning indicators of HIV drug resistance technical report [Internet]. 2016. Available from: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/246219/9789241511179-eng.pdf>
3. World Health Organization (WHO). Global action plan on HIV drug resistance [Internet]. 2017. Available from: <http://apps.who.int/bookorders>.
4. Elizabeth Glaser Pediatric AIDS Foundation (EGPAF). UNAIDS Issues New Fast-Track Strategy to End AIDS by 2030 [Internet]. 2014. Available from: <https://www.pedaids.org/2014/11/20/unaids-issues-new-fast-track-strategy-to-end-aids-by-2030/>
5. Phillips AN, Stover J, Cambiano V, Nakagawa F, Jordan MR, Pillay D, et al. Impact of HIV drug resistance on HIV/AIDS-associated mortality, new infections, and antiretroviral therapy program costs in Sub-Saharan Africa. *J Infect Dis.* 2017;215(9):1362–5.
6. World Health Organization (WHO). HIV Drug Resistance Report 2017 [Internet]. 2017. Available from: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255896/9789241512831-eng.pdf>
7. Ngarina M, Kilewo C, Karlsson K, Aboud S, Karlsson A, Marrone G, et al. Virologic and immunologic failure, drug resistance and mortality during the first 24 months postpartum among HIV-infected women initiated on antiretroviral therapy for life in the Mitra plus Study, Dar es Salaam, Tanzania. *BMC Infect Dis.* 2015;15(1).
8. Cambiano V, Bertagnolio S, Jordan MR, Pillay D, Perriens JH, Venter F, et al. Predicted levels of HIV drug resistance: Potential impact of expanding diagnosis, retention, and eligibility criteria for antiretroviral therapy initiation. *AIDS.* 2014;28(SUPPL. 1).
9. UNAIDS. AIDSinfo | UNAIDS [Internet]. Available from: <https://aidsinfo.unaids.org/>
10. United Nations International Children's Emergency Fund (UNICEF). HIV and AIDS in Adolescents [Internet]. 2019. Available from: <https://data.unicef.org/topic/adolescents/hiv-aids/>
11. World Health Organization (WHO). HIV and Adolescents: Guidance for HIV Testing and Counselling and Care for Adolescents Living with HIV. WHO Publ [Internet]. 2013; Available from: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/94334/9789241506168\\_eng.pdf?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/94334/9789241506168_eng.pdf?sequence=1)
12. Sigaloff KCE, Calis JCJ, Geelen SP, Van Vugt M, Rinke De Wit TF. HIV-1-resistance-associated mutations after failure of first-line antiretroviral treatment among children in resource-poor regions: a systematic review. *Lancet Infect Dis.* 2011;11:769–79.



## PONE-D-20-09317-R1

13. D'Aquila RT, Johnson VA, Welles SL, Japour AJ, Kuritzkes DR, DeGruttola V, et al. Zidovudine resistance and HIV-1 disease progression during antiretroviral therapy. AIDS Clinical Trials Group Protocol 116B/117 Team and the Virology Committee Resistance Working Group. *Ann Intern Med*. 1995;122(6):401–8.
14. Havlir D V., Marschner IC, Hirsch MS, Collier AC, Tebas P, Bassett RL, et al. Maintenance antiretroviral therapies in HIV-infected subjects with undetectable plasma HIV RNA after triple-drug therapy. *N Engl J Med*. 1998;339(18):1261–8.
15. Miller V, Phillips A, Rottmann C, Staszewski S, Pauwels R, Hertogs K, et al. Dual Resistance to Zidovudine and Lamivudine in Patients Treated with Zidovudine-Lamivudine Combination Therapy: Association with Therapy Failure. *J Infect Dis*. 1998;177(6):1521–32.
16. Rey D, Hughes M, Pi JT, Winters M, Merigan TC, Katzenstein DA. HIV-1 reverse transcriptase codon 215 mutation in plasma RNA: immunologic and virologic responses to zidovudine. The AIDS Clinical Trials Group Study 175 Virology Team. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 1998;17(3):203–8.
17. Granich RM, Gilks CF, Dye C, De Cock KM, Williams BG. Universal voluntary HIV testing with immediate antiretroviral therapy as a strategy for elimination of HIV transmission: a mathematical model. *Lancet*. 2009;373(9657):48–57.
18. World Health Organization (WHO). WHO Manual for HIV Drug Resistance Testing using Dried Blood Specimens [Internet]. 2010. Available from: [https://www.who.int/hiv/pub/drugresistance/dried\\_blood\\_spots/en/](https://www.who.int/hiv/pub/drugresistance/dried_blood_spots/en/)
19. Holguín Á, Yebra G, Martín L, de Pineda AT, Ruiz LE, Quezada AY, et al. Transmitted drug-resistance in human immunodeficiency virus-infected adult population in El salvador, central america. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19(12).
20. National Agency for AIDS Research (ANRS). ANRS AC11 Resistance Study Group PCR and Sequencing Procedures: HIV-1 [Internet]. 2015. Available from: <http://www.hivfrenchresistance.org/ANRS-procedures.pdf>
21. Stamatakis A. RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*. 2014;30(9):1312–3.
22. Price MN, Dehal PS, Arkin AP. FastTree 2 - Approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One*. 2010;5(3).
23. Martin DP, Lemey P, Lott M, Moulton V, Posada D, Lefevre P. RDP3: A flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics*. 2010;26(19):2462–3.
24. Robins EB, Blum S. Hematologic reference values for African American children and adolescents. *Am J Hematol*. 2007;82(7):611–4.
25. Muwonga J, Edidi S, Butel C, Vidal N, Monleau M, Okenge A, et al. Resistance to antiretroviral drugs in treated and drug-naïve patients in the democratic Republic of Congo. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2011;57(SUPPL. 1):27–33.
26. Djoko CF, Rimoin AW, Vidal N, Tamoufe U, Wolfe ND, Butel C, et al. High HIV type 1

## PONE-D-20-09317-R1

- group M pol diversity and low rate of antiretroviral resistance mutations among the uniformed services in Kinshasa, Democratic Republic of the Congo. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2011;27(3):323–9.
27. Vidal N, Mulanga C, Bazepeo SE, Mwamba JK, Tshimpaka J, Kashi M, et al. HIV type 1 pol gene diversity and antiretroviral drug resistance mutations in the Democratic Republic of Congo (DRC). *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2006;22(2):202–6.
  28. Kamangu EN, Chatt A, Susin F, Boreux R, Kalala RL, Mvumbi GL, et al. Genetic Diversity and Antiretroviral Drug Resistance among Drug-Naïve HIV Type 1 Infected Patients attending Clinics in Kinshasa, Democratic Republic of Congo. *J HIV AIDS*. 2015;1.1:1–6.
  29. Boillot F, Serrano L, Muwonga J, Kabuayi JP, Kambale A, Mutaka F, et al. Implementation and Operational Research: Programmatic Feasibility of Dried Blood Spots for the Virological Follow-up of Patients on Antiretroviral Treatment in Nord Kivu, Democratic Republic of the Congo. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2016;71(1):e9–15.
  30. Programme National Multisectoriel de Lutte contre le Sida (RDCongo). Plan Stratégique National de la riposte au VIH/Sida 2018-2021 – PNMLS [Internet]. 2018. Available from: [http://www.pnmls.cd/doc/PSN 2018 - 2021.pdf](http://www.pnmls.cd/doc/PSN%202018%20-%202021.pdf)
  31. Gils T, Bossard C, Verdonck K, Owiti P, Casteels I, Mashako M, et al. Stockouts of HIV commodities in public health facilities in Kinshasa: Barriers to end HIV. *PLoS One*. 2018;13(1).
  32. World Health Organization (WHO). HIV Drug Resistance Report 2019 [Internet]. 2019. Available from: <https://www.who.int/hiv/pub/drugresistance/hivdr-report-2019/en/>
  33. de Waal R, Lessells R, Hauser A, Kouyos R, Davies M, Egger M, et al. HIV Drug Resistance in Sub-Saharan Africa: Public Health Questions and the Potential Role of Real-World Data and Mathematical Modelling. *J Virus Erad*. 2018;4(2):55–58.
  34. Wensing A, Calvez V, Ceccherini-Silberstein F, Charpentier C, Günthard H, Paredes R, et al. 2019 Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1. *Top Antivir Med*. 2019;27(3).
  35. Oliveira M, Ibanescu RI, Pham HT, Brenner B, Mesplede T, Wainberg MA. The M184I/V and K65R nucleoside resistance mutations in HIV-1 prevent the emergence of resistance mutations against dolutegravir. *AIDS*. 2016;30(15):2267–73.
  36. Kwon EH, Musema GMA, Boelter J, Townsend S, Tshala-Katumbay D, Kayembe PK, et al. HIV-1 subtypes and drug resistance mutations among female sex workers varied in different cities and regions of the Democratic Republic of Congo. *PLoS One*. 2020;15(2):e0228670.
  37. Newell ML, Coovadia H, Cortina-Borja M, Rollins N, Gaillard P, Dabis F. Mortality of infected and uninfected infants born to HIV-infected mothers in Africa: A pooled analysis. *Lancet*. 2004;364(9441):1236–43.
  38. Rubio-Garrido M, González-Alba JM, Reina G, Ndarabu A, Barquín D, Carlos S, et al. Current and historic HIV-1 molecular epidemiology in paediatric and adult population

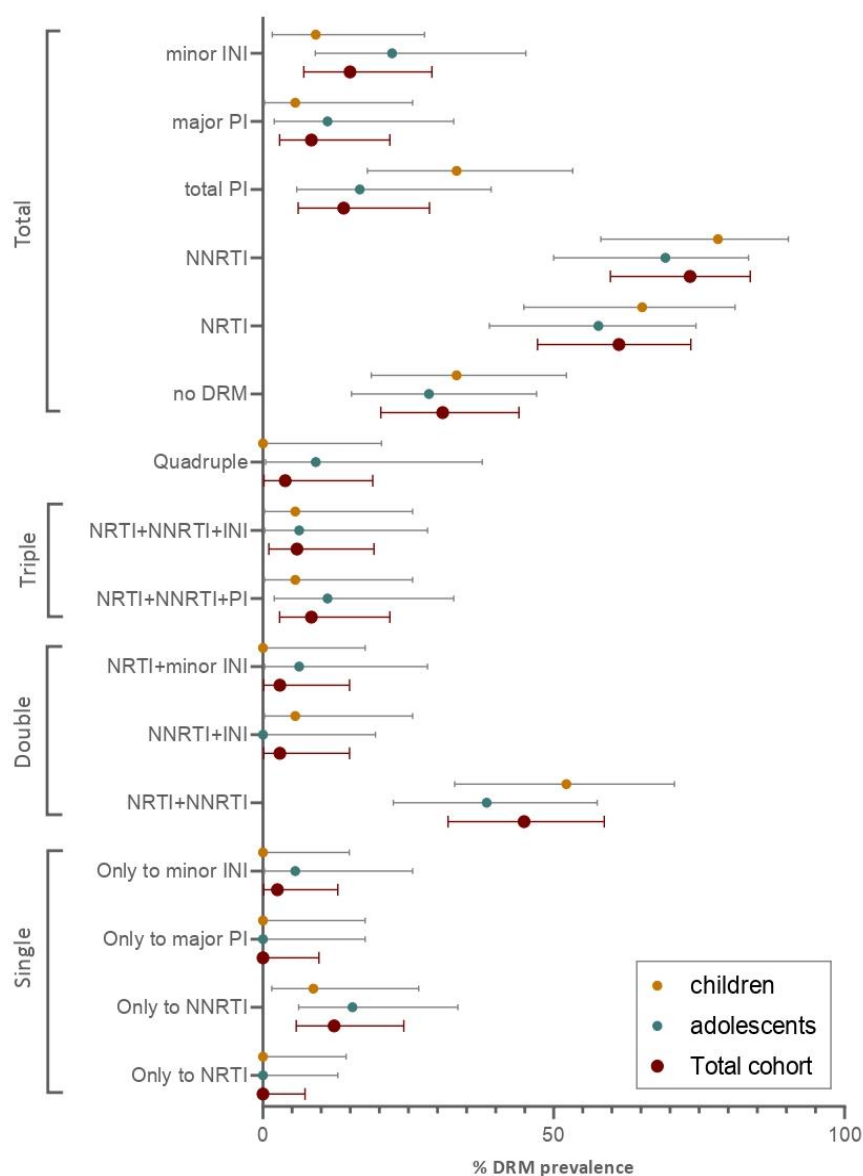
PONE-D-20-09317-R1

from Kinshasa in the Democratic Republic of Congo. *Sci Rep.* 2020;10(1).

39. Stadel KM, Richman DD. Rates of emergence of HIV drug resistance in resource-limited settings: A systematic review. Vol. 18, *Antiviral Therapy*. 2013. p. 115–23.
40. United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). Understanding Fast-Track: Accelerating action to end the AIDS epidemic by 2030 [Internet]. 2020. Available from: [https://www.unaids.org/sites/default/files/media\\_asset/201506\\_JC2743\\_Understanding\\_FastTrack\\_en.pdf](https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/201506_JC2743_Understanding_FastTrack_en.pdf)



Figure 1 R1

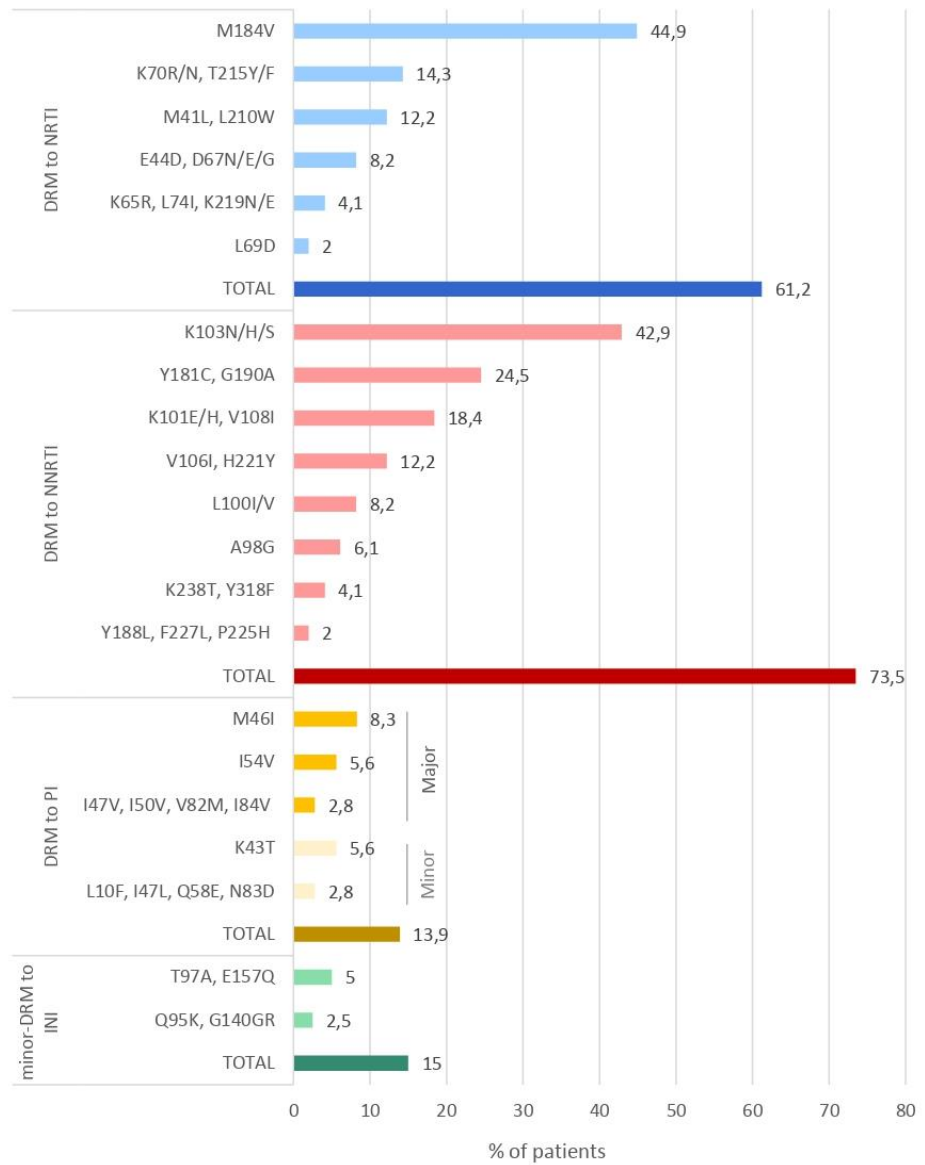
[Click here to access/download;Figure;R1. Fig 1.pdf](#)**Fig 1. Rate of patients carrying DRM to the main ARV families at study population.**

**Legend Fig 1.** Mean DRM prevalence (colored dots) and 95% confidence intervals on the study cohort with available sequence by age. Single resistance, to one ARV family; double, triple or quadruple resistance, to one ARV family and total DRM ARV families. DRM to PI are always major unless otherwise indicated. DRM to INI are always minor. ARV, antiretroviral drugs; NRTI, nucleoside transcriptase reverse inhibitor; NNRTI, non-nucleoside transcriptase reverse inhibitor; PI, Protease inhibitor; INI, integrase inhibitors. Rates calculated considering available sequences (55) reported in **Table 1**. More data available in **S1 Table**.

Figure 2 R1

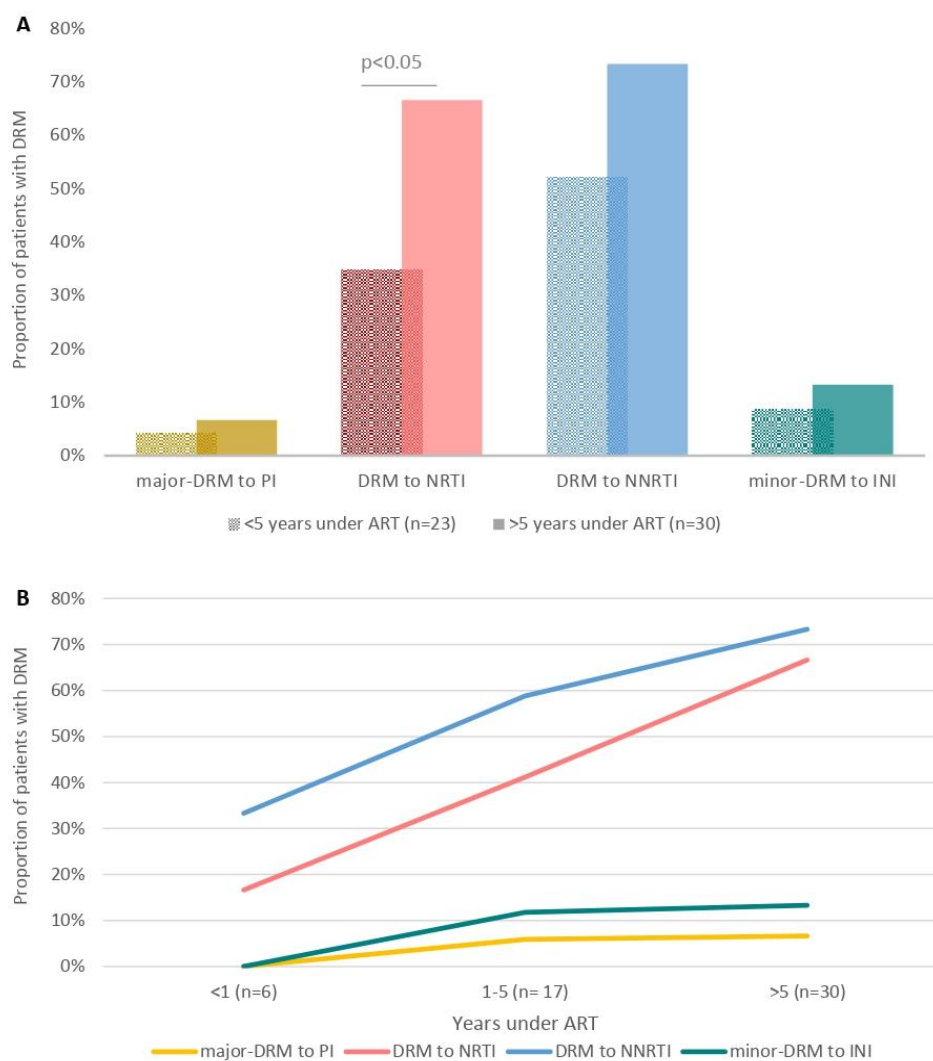
[Click here to access/download;Figure;R1. Fig 2.pdf](#)

**Fig 2. Drug resistance mutations to the main antiretroviral families in the study population.**



**Legend Fig 2.** DRM, drug resistance mutation; NRTI, nucleoside transcriptase reverse inhibitor; NNRTI, non-NRTI; PI, Protease inhibitor; INI, integrase inhibitor. Available sequences in 55 patients under study: 38PR, 49RT and 40IN. More data available in **S2 Table**.

Figure 3 R1

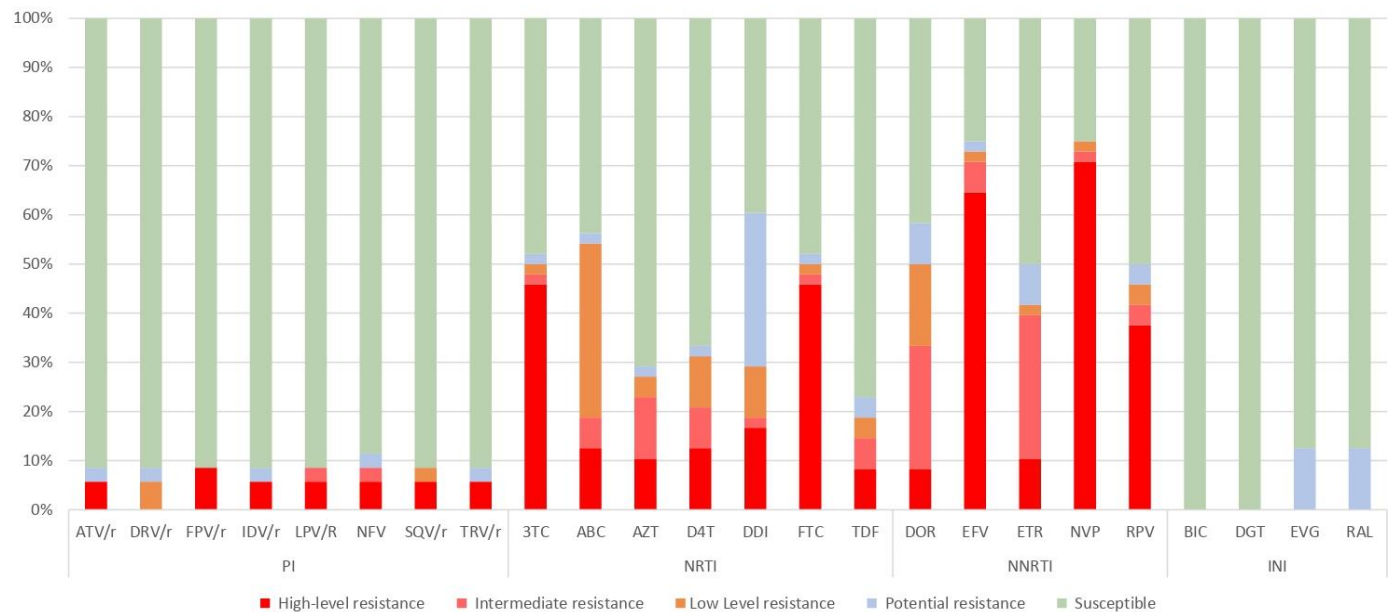
[Click here to access/download;Figure;R1. Fig 3.pdf](#)**Fig 3. HIV-infected patients carrying DRM (A) and trends (B) according to ART exposure time in the study population.**

**Legend Fig 3.** ART, antiretroviral therapy; DRM; drug resistance mutation; NRTI, nucleoside reverse transcriptase inhibitor; NNRTI, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor; PI, protease inhibitor; INI, integrase inhibitor; n, number of patient. In 2 of the 55 subjects time under ART was unknown.

Figure 4 R1

[Click here to access/download;Figure;R1. Fig 4.pdf](#)

**Fig 4. Predicted ARV susceptibility by Stanford in patients with available sequence.**



**Legend Fig 4.** Predicted ARV susceptibility in 38PR/49RT/40IN available sequences from 55 patients under study. NRTI, nucleoside reverse transcriptase inhibitor; NNRTI, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor; PI, protease inhibitor; INI, integrase inhibitor; ATV/r, Atazanavir/Ritonavir; DRV, Darunavir; FPV, Fosamprenavir; IDV/r, Indinavir/Ritonavir; LPV/r, Lopinavir/Ritonavir; NFV, Nelfinavir; SQW, Saquinavir; TPV/r Tipranavir/Ritonavir; ABC, Abacavir; AZT, Zidobudine; D4T, Estavudine; DDI, Didanosine; FCT, Emtricitabine; 3TC, Lamivudine; TDF, Tenofovir; DOR: Doravirine; EFV, Efavirenz; ETR, Etravirine; NVP, Nevirapine; RPV, Rilpivirine; DGT, Dolutegravir; EVG, Elvitegravir; RAL, Raltegravir. Information per patient in S1 Fig.

## Medicine

### EFFECT OF HIV EXPOSURE AND INFECTION ON IMMUNE PROFILE: A PILOT STUDY ON A PAEDIATRIC POPULATION

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	MD-D-20-11900
Article Type:	OA: Observational Study (STROBE Compliant)
Section/Category:	4850 HIV/AIDS Channel
Keywords:	HIV infection; HIV exposure; inflammatory biomarkers; Children; Dried blood specimens (DBS).
Corresponding Author:	Africa Holguin IRYCIS Madrid, -- State SPAIN
First Author:	Marina Rubio-Garrido
Order of Authors:	Marina Rubio-Garrido José Avendaño-Ortiz Adolphe Ndarabu Carolina Rubio Gabriel Reina Eduardo López-Collazo Africa Holguin
Manuscript Region of Origin:	SPAIN
Abstract:	<p>Programs to prevent mother-to-child-HIV-transmission do not reduce the number of infants exposed during pregnancy and breastfeeding. HIV exposed but uninfected children (HEU) present higher risk of morbidity, mortality and growth failure rate than HIV unexposed and uninfected children (UU). Immune biomarkers analysis could improve HIV disease progression study, predicting comorbidity risk. This pilot study analyzes the impact of HIV exposure and infection on immune profiles in 30 children under clinical follow-up in Kinshasa: 10 HIV-infected (HIV+), 10 HEU and 10 UU. Gene expression levels of 10 immune biomarkers (CD14, HVEM, B7.1, HIF-1<math>\alpha</math>, Siglec-10, IRAK-M, CD163, B7H5, PD-L1 and Galectin-9) were measured in dried blood (DBS) by reverse-transcription of total RNA and RT-qPCR. The results of each biomarker was compared among groups by principal component analysis and Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests.</p> <p>HIV+ children presented significantly higher levels of six biomarkers (CD14, HVEM, B7.1, Siglec-10, HIF-1<math>\alpha</math> and CD163) than UU group. In HEU, we found six biomarkers significantly elevated (CD14, HVEM, B7.1, Siglec-10, HIF-1<math>\alpha</math> and IRAK-M) vs . UU. Five biomarkers (CD14, HVEM, B7.1, Siglec-10 and HIF-1<math>\alpha</math>) presented significantly higher expression in both HIV+ and HEU vs. UU, with HVEM and CD14 significantly overexpressed among HIV+ vs. HEU.</p> <p>Significant differences in specific biomarkers expression across groups strongly suggest the effect of HIV infection and/or HIV exposure on these immune biomarkers expression. The study supports DBS as alternative sample to plasma for immune biomarker quantification.</p>

**EFFECT OF HIV EXPOSURE AND INFECTION ON IMMUNE PROFILE: A PILOT STUDY ON  
A PAEDIATRIC POPULATION**

Marina Rubio-Garrido<sup>1,\*</sup>, José Avendaño-Ortiz<sup>2,3,\*</sup>, Adolphe Ndarabu<sup>4</sup>, Carolina Rubio<sup>3</sup>,  
Gabriel Reina<sup>5</sup>, Eduardo López-Collazo<sup>2,3,#</sup>, África Holguín<sup>1,#</sup>

<sup>1</sup> HIV-1 Molecular Epidemiology Laboratory, Microbiology Department. Ramón y Cajal University Hospital-IRYCIS and CIBERESP-RITIP, Madrid, Spain

<sup>2</sup> Innate Immunity Group, IDIPaz-La Paz University Hospital, Madrid, Spain

<sup>3</sup> Tumor Immunology Laboratory and Innate Immunity Group, IDIPaz-La Paz University Hospital, Madrid, Spain

<sup>4</sup> Monkole Hospital, Kinshasa, Democratic Republic of Congo

<sup>5</sup> University Clinic of Navarra, Pamplona, Spain

\*These authors contributed equally to this work.

#Corresponding authors:

África Holguín

HIV-1 Molecular Epidemiology Laboratory  
IRYCIS- Ramón y Cajal University Hospital-and CIBERESP-RITIP  
Ctra. Colmenar Viejo, Km 9,100, 28034 Madrid, Spain  
E-mail: [afrika.holguin@salud.madrid.org](mailto:afrika.holguin@salud.madrid.org)  
Phone: +34-913368153

Eduardo López-Collazo

IdiPAZ, La Paz University Hospital,  
Paseo de La Castellana 261, 28046 Madrid, Spain  
E-mail: [elopezc@salud.madrid.org](mailto:elopezc@salud.madrid.org)  
Phone: +34-912071029



**1 ABSTRACT**

2 Programs to prevent mother-to-child-HIV-transmission do not reduce the number of  
3 infants exposed during pregnancy and breastfeeding. HIV exposed but uninfected  
4 children (HEU) present higher risk of morbidity, mortality and growth failure rate than  
5 HIV unexposed and uninfected children (UU). Immune biomarkers analysis could  
6 improve HIV disease progression study, predicting comorbidity risk. This pilot study  
7 analyzes the impact of HIV exposure and infection on immune profiles in 30 children  
8 under clinical follow-up in Kinshasa: 10 HIV-infected (HIV+), 10 HEU and 10 UU. Gene  
9 expression levels of 10 immune biomarkers (CD14, HVEM, B7.1, HIF-1 $\alpha$ , Siglec-10, IRAK-  
10 M, CD163, B7H5, PD-L1 and Galectin-9) were measured in dried blood (DBS) by reverse-  
11 transcription of total RNA and RT-qPCR. The results of each biomarker was compared  
12 among groups by principal component analysis and Kruskal-Wallis and Mann-Whitney  
13 tests.

14 HIV+ children presented significantly higher levels of six biomarkers (CD14, HVEM, B7.1,  
15 Siglec-10, HIF-1 $\alpha$  and CD163) than UU group. In HEU, we found six biomarkers  
16 significantly elevated (CD14, HVEM, B7.1, Siglec-10, HIF-1 $\alpha$  and IRAK-M) vs. UU. Five  
17 biomarkers (CD14, HVEM, B7.1, Siglec-10 and HIF-1 $\alpha$ ) presented significantly higher  
18 expression in both HIV+ and HEU vs. UU, with HVEM and CD14 significantly  
19 overexpressed among HIV+ vs. HEU.

20 Significant differences in specific biomarkers expression across groups strongly suggest  
21 the effect of HIV infection and/or HIV exposure on these immune biomarkers  
22 expression. The study supports DBS as alternative sample to plasma for immune  
23 biomarker quantification.

**24 INTRODUCTION**

25 Among the 37 million people living with human immunodeficiency virus (HIV), more  
26 than half are women and nearly 2 million are children younger than 15<sup>1</sup>. The  
27 implementation of programs to prevent mother-to-child HIV transmission (MTCT)  
28 reduces the number of newly infected children. However, high maternal HIV incidence  
29 and deficient HIV testing and viraemia control for pregnant and postpartum women  
30 contribute substantially to viral transmission and to HIV exposure to infants during  
31 pregnancy and breastfeeding in settings with a high HIV burden. This is the case of the  
32 Democratic Republic of Congo (DRC), with 0.8% HIV prevalence [0.6-0.9] <sup>1,2</sup>. In DRC,  
33 nearly 51,000 children are living with HIV mainly due to high MTCT rate of 27.1% [24.4-  
34 30], as well as 310,000 HIV-exposed but born uninfected children (HEU), according to  
35 the estimation of the most recent Joint United Nations Programme on HIVAIDS  
36 (UNAIDS)<sup>1</sup>.

37 HEU present 3.9-fold and 2.0-fold higher mortality rate than HIV unexposed an  
38 uninfected children (UU) during the first and second year of life, respectively<sup>3</sup>. Mortality  
39 is most commonly due to acute respiratory infections, diarrhoea/dysentery,  
40 malnutrition, sepsis and meningitis. HEU are more likely to be premature and smaller  
41 than normal for their gestational age than UU, have more postnatal growth failure, 50%  
42 more hospitalizations in the neonatal period and 30% more clinic visits during infancy,  
43 particularly for skin infections, lower respiratory tract infections and oral thrush<sup>3</sup>. The  
44 lower rates of breastfeeding in exposed infants can reduce their protection from HIV and  
45 other infections, with an increased risk of death from malnutrition, diarrhoea and pneumonia  
46 if the infants are not exclusively breastfed<sup>4</sup>. In addition, reduced care due to parental illness  
47 or death can also increase the exposure to other infections among HEU<sup>5</sup>. However,  
48 despite the public health importance of the enormous number of HEU involved in the  
49 epidemic, health supervision specifically addressing the HEU population is scarce  
50 worldwide and has been largely neglected<sup>5</sup>.

51 The increased risk of infectious morbidity, mortality and growth failure observed among  
52 HEU<sup>5</sup> is due to greater immune activation and inflammation<sup>3,6-8</sup>, with lower T cell  
53 functionality and higher monocyte activation in HEU vs. UU<sup>8,9</sup>. Expression of immune-  
54 checkpoints, regulators of T cell immune responses in response to invading pathogens<sup>10</sup>,  
55 and of other immunological biomarkers can be altered during HIV infection despite



56 viraemia control or undetectable viral load<sup>11</sup>. These checkpoints can be used as  
57 biomarkers for monitoring HIV disease progression and therapeutic response in  
58 individuals infected with HIV<sup>10</sup>, just as they can in other chronic infectious diseases and  
59 cancer<sup>12,13</sup>. They can also predict the risk of comorbidities associated with chronic  
60 inflammation<sup>14</sup>. This study intends to evaluate for the first time the use of dried blood  
61 to measure the expression of the immune markers as an alternative to serum/plasma.  
62 DBS use facilitates blood samples collection, storage and transport to centralised  
63 facilities for HIV diagnosis and monitoring in settings with limited infrastructure for  
64 plasma/serum collection, as well as, when low blood volumes are available, such as in  
65 neonates and in children with low weight<sup>15</sup>. Studies reporting different expression levels  
66 of immune biomarkers in HEU are scarce and are limited to a few biomarkers, mainly in  
67 plasma<sup>7-9,16</sup>. This pilot study provides pioneer data on the gene expression of 10 immune  
68 biomarkers by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR),  
69 using dried blood samples (DBS) in three groups of paediatric participants: HIV-infected  
70 (HIV+), HEU and UU, in a paediatric cohort from the DRC. We present, for the first time,  
71 data on new immune biomarkers presenting higher expression during HIV exposure  
72 and/or HIV infection for the paediatric population.

73 The objective of this study is to analyze the influence of HIV infection and exposure-HIV  
74 on the immune status of three groups of children (HIV+, HEU and UU). For it, we  
75 measured 10 new immune biomarkers in DBS samples where will observe the usefulness  
76 of this type of sample as an alternative to the sample or serum. This study is also the  
77 first to use dried blood (not plasma/serum) to measure these immune biomarkers  
78 expression.

**79 METHODS****80 Study design and sample collection**

81 The study was conducted in accordance with the ethical guidelines of the 1975  
82 Declaration of Helsinki and was approved by La Paz Hospital Ethics Committee. An  
83 informed consent was obtained from parents, legally acceptable representative or  
84 guardians of participants' statements. The STROBE statement for observational studies  
85 is provided in the supplementary material for more details in the study design.

86 DBS were collected from 85 paediatric participants under clinical follow-up in Monkole  
87 Hospital in Kinshasa (DRC) from April to November 2016. We checked the HIV status of  
88 all of them and selected 10 patients with HIV-infection (HIV+), 10 patients from  
89 confirmed HIV+ mother (exposed) but uninfected (HEU) and 10 uninfected and  
90 unexposed children (UU). Participants had a median [IQR] age of 12.2 [10.7-15.3], 3 [0-  
91 8.5] and 10.5 [8.3-12] years old, respectively. This study is considered a case-control study  
92 in which the UU group is the control group and we compared its results with HEU and  
93 HIV+ groups.

94 DBS were prepared by spotting with micropipette 70 µl of venous blood collected by  
95 venopuncture in EDTA anticoagulant tubes into each dot on a Whatman 903 Protein  
96 Saver Card (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany).

97

**98 HIV diagnosis and viraemia quantification**

99 HIV diagnosis was firstly performed in DRC using rapid serological tests: Determine™  
100 HIV-1/2 Ag/Ab (Alere), Double-Check Gold HIV 1&2 (Orgenics) and Uni-Gold HIV (Trinity  
101 Biotech) from 18-months old and by Biomerieux 4th generation immunoassay VIDAS®  
102 HIV Duo Ultra or in exceptional cases, by molecular Abbott real-time HIV-1 Qualitative  
103 in infants under 18-months old. In Madrid, Spain, HIV serological status in the 85  
104 children was confirmed with BioRad Geenius™ HIV-1/2 confirmatory assay using one  
105 DBS dot per patient, as previously reported<sup>17</sup>. All HIV seropositive and undetermined  
106 pediatric DBS by Geenius were then tested by molecular POC test Cepheid Xpert Qual  
107 (Xpert Qual), which provides a binary "detected"/"not detected" result<sup>18</sup>.  
108 HIV-1 viremia was quantified using COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test  
109 v2.0 (Roche VL)<sup>19</sup> in all HIV+ DBS, based on real time amplification of HIV genome. All

assays were performed using one dot eluted in Roche SPEX buffer as lysis buffer to elute the DBS dots, according to manufacturer's instructions. We provided the number of HIV-1 RNA copies per plasma milliliter after considering patient's hematocrit assuming 39% hematocrit for children<sup>20</sup>.

#### Tested immune biomarkers

We analysed the levels of 10 immune biomarkers: B7.1 (membrane protein presents in activated antigen presenting cells)<sup>21</sup>; B7H5 (V-domain Ig suppressor of T cell activation)<sup>22</sup>; IRAK-M (interleukin-1 receptor associated kinase)<sup>21</sup>; Galectin-9 (glycan-binding protein)<sup>23</sup>; Siglec-10 (sialic acid-binding Ig-like lectin 10)<sup>24</sup>; HIF-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor 1-alpha, a transcription factor)<sup>21</sup>; HVEM (herpes virus entry mediator)<sup>23</sup>; CD14 (co-receptor for lipopolysaccharide released from monocytes upon activation)<sup>25</sup>; CD163 (marker of monocyte/macrophage activated cells)<sup>25</sup> and PD-L1 (programmed death-ligand 1)<sup>21,23</sup>. We selected these biomarkers because of their previous reported implication in HIV and other infections/pathologies<sup>21,23,25</sup>. **Error! Reference source not found.**

#### Biomarker quantification by RT-PCR

To quantify these immune biomarkers in each patient, nucleic acids were extracted from two DBS dots using the NucliSENS EasyMAG automated platform (BioMerieux). cDNA was synthesised from 0.25 $\mu$ g total RNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Reverse transcription quantitative polymerase chain reactions (RT-qPCRs) were performed using the QuantiMix Easy SYG Kit (Biotools), according to the manufacturer's instructions. Gene expression levels were analysed using the LightCycler system (Roche Diagnostics). The cDNA copy number of each gene of interest was determined using a 7-point standard curve. Reactions were run in duplicate and the expression level of  $\beta$ -ACTIN housekeeping gene was used as internal standard to normalise data in the relative expression of each biomarker. All the primers included exon-exon junctions to avoid genomic DNA contamination and synthesised by Europins Genomics. Specific primers for each gene are shown in **Supplementary Table S1**.

**140 Statistical Analysis**

141 Principal components were calculated using the function princomp of R language. The  
142 default method performed a principal components analysis on the given numeric data  
143 matrix and returned the results as an object of class. The calculation was done by a  
144 singular value decomposition of the centred and scaled data matrix. The print method  
145 for these objects and the plot method were performed using the packages R ggplot and  
146 ggbiplot. The Kruskal-Wallis non parametric test was performed for overall comparison  
147 of the three groups. After that, the Mann-Whitney U test was used to study the  
148 differences among group. The significance level used for the hypothesis contrast tests  
149 was set at  $p < .05$ . Statistical analyses were conducted using Prism 6.0 software from  
150 GraphPad.



## 151 **RESULT**

### 152 **Study population**

153

154 The main features of the study's paediatric population are shown in **Table 1**. Both HIV+  
 155 and UU groups presented similar median age at sampling, higher than the HEU group  
 156 (12 and 10.5 years old vs. 3 years old, respectively). All children with HIV were under  
 157 antiretroviral treatment, although none presented suppressed viraemia at sampling.  
 158 Among the HEU group, seven had previously received antiretrovirals, five as prophylaxis.  
 159 Four of the HEU group presented maternal anti-HIV antibodies at sampling, all under 18  
 160 months of age (from 0 to 4.8 months old).

161

### 162 **HIV infected, exposed and unexposed children have differential immune markers** 163 **profiles**

164 To reveal the effects of HIV infection and exposure on immune status, we decided to  
 165 study the overall differences between children groups. To do that, we performed a  
 166 principal component analysis (PCA) for the expression of ten immune markers in DBS  
 167 samples from our cohort. The four principal components explained 90.24% of variance  
 168 (**Table 2**). The results of PCA showed that the immune marker profiles in UU children  
 169 differed substantially from those HEU and HIV-infected groups (**Fig.1**).

170

171 Once the differences in the immunological profiles between the groups were proven,  
 172 we decided to study the expression profile of each marker separately. We identified  
 173 some immune markers increased in children with HIV infection when comparing the  
 174 HIV+, HEU and UU groups. HIV+ children presented significantly higher levels of six of  
 175 the 10 biomarkers (CD14, HVEM, B7.1, Siglec-10, HIF-1 $\alpha$  and CD163) than those in the  
 176 UU group (**Fig.2A–2F**). The T cell activation suppressor B7H5 also exhibited higher  
 177 expression in the HIV+ group compared with the UU group, but with no statistical  
 178 significance (**Fig. 2H**). On one hand, five of these biomarkers (CD14, HVEM, B7.1, Siglec-  
 179 10, HIF-1 $\alpha$ ) were related to both HIV exposure and infection, presenting significantly  
 180 higher expression in both the HIV+ and HEU groups than in the UU group (**Fig.2A-E**).  
 181 CD14 and HVEM were significantly more expressed in the HIV+ than the HEU (**Fig.2A-B**),

182 and the expression of B7.1, Siglec-10, HIF-1 $\alpha$ , CD163, IRAK-M, B7H5, PD-L1 and Galectin-  
183 9 was similar in the HIV+ and HEU groups (**Fig.2C-J**).

184 On the other hand, we found immune markers increased with HIV exposure. When  
185 comparing HEU with UU, six biomarkers were significantly elevated after HIV exposure  
186 (CD14, HVEM, B7.1, Siglec-10, HIF-1 $\alpha$  and IRAK-M) (**Fig.2A-E, 2G**). IRAK-M was only  
187 increased by HIV exposure, presenting significantly higher level in the HEU vs. UU group  
188 (**Fig. 2G**).

189 Others immune biomarkers did not seem to be affected by HIV exposure or infection.  
190 Levels of B7H5 (**Fig.2H**), PD-L1 (**Fig.2I**) and Galectin-9 (**Fig.2J**) did not show statistically  
191 significant differences between groups. However, B7H5 tended to be higher in the HIV+  
192 group compared with the HEU and UU groups and in the HEU vs. the UU group.

193 **DISCUSSION**

194 Immune status monitoring could predict the risk of HIV-related comorbidities and  
 195 chronic immune dysfunction, especially persistent inflammation due to chronic HIV  
 196 production, which contributes to the enhanced risk of morbidity and mortality among  
 197 people with HIV<sup>11,14</sup>. In this context, this pilot study provides pioneering data on the  
 198 expression of 10 immune markers in three groups of paediatric patients with or without  
 199 HIV infection or exposure including CD14 and CD163, which are immune biomarkers of  
 200 myeloid origin with the greatest clinical impact in terms of predicting morbidity and  
 201 mortality<sup>25-27</sup>. Our data by PCA and the single marker-by-marker analysis demonstrates  
 202 that both HIV exposition during pregnancy and HIV infection alters the immune profile.  
 203 The present report is also the first study using dried blood instead of plasma/serum to  
 204 measure the gene expression of these specific immune markers.

205 It is well known that HIV infection increases plasma levels of some soluble immune  
 206 biomarkers compared with uninfected<sup>7,28-30</sup>, even in well-controlled ART-treated HIV-  
 207 infected with suppressed viraemia<sup>11,30</sup>. We found that HIV+ children presented  
 208 significantly higher levels of six biomarkers (CD14, HVEM, B7.1, Siglec-10, HIF-1 $\alpha$  and  
 209 CD163) than UU group. These results are in agreement with previous studies reporting  
 210 an increase in soluble CD14 and CD163 in plasma associated with HIV infection<sup>29,30</sup> and  
 211 a higher CD163 level in HIV-infected macrophages due to chronic inflammation<sup>31</sup>. CD163  
 212 has been independently associated with incident chronic kidney disease, chronic lung  
 213 disease and liver disease in treated individuals with HIV<sup>31</sup>. Regarding HIV exposure, our  
 214 study reports pilot data regarding significantly higher mRNA expression of six immune  
 215 biomarkers (CD14, HVEM, B7.1, Siglec-10, HIF-1 $\alpha$  and IRAK-M) in HIV infected and HIV  
 216 exposed children vs. UU. Only few studies have analyzed immune biomarkers (mainly  
 217 soluble) in HEU, describing decreased T cell functionality after pathogenic stimuli<sup>9</sup>, and  
 218 higher inflammation and monocyte activation by increased levels of some soluble  
 219 inflammatory biomarkers in plasma<sup>7,8</sup> in HEU adults compared with UU. However, none  
 220 has reported RNA levels of the 10 analysed biomarkers in HEU compared with HIV+ and  
 221 UU, as our study did. IRAK-M has been associated with inflammatory bowel diseases<sup>32</sup>.  
 222 Interestingly, five biomarkers (CD14, HVEM, B7.1, Siglec-10, HIF-1 $\alpha$ ) presented  
 223 significantly higher expression in both HIV+ and HEU vs. UU, with HVEM and CD14  
 224 significantly overexpressed among HIV+ vs. HEU. HVEM is highly expressed on HIV-



225 infected T-CD4 cells, and is involved at HIV entry<sup>33</sup>, which might explain the significantly  
226 higher HVEM expression observed in HIV-infected compared with HEU and UU.  
227 However, the reason HVEM is also more expressed in the HEU vs. UU group remains to  
228 be clarified. HIF-1 $\alpha$  accumulates in the presence of HIV infection, since HIV-1 Vpr protein  
229 activates the oxidative stress pathway required for HIF-1 $\alpha$  expression, explaining the  
230 high HIF-1 $\alpha$  levels in HIV-infected individuals<sup>34</sup>. Despite the absence of HIV infection and,  
231 consequently, of Vpr viral protein, the HEU group presented high HIF-1 $\alpha$  expression  
232 similar to the HIV+ group. Alternative molecular mechanisms for HIF-1 $\alpha$  overexpression  
233 in HEU vs. UU should be clarified, as occurs in other clinical contexts as lung cancer<sup>35</sup>.

234 Regarding B7.1, it is known that the HIV-1 nef protein removes B7.1 from the cell surface  
235 by modifying Golgi routes and preventing T lymphocyte activation<sup>36</sup>. Siglec-10 was  
236 detected on subsets of human leukocytes, including eosinophils, monocytes and a minor  
237 population of natural killer-like cells, and could function as an inhibitory receptor within  
238 the innate immune system<sup>37</sup>. However, given that both biomarkers were also  
239 significantly elevated in the HEU vs. UU group in the absence of viral proteins, the effect  
240 of HIV exposure in mRNA B7.1 and Siglec-10 expression need to be further studied.

241 B7H5, PD-L1 and Galectin-9 levels were similar across groups, suggesting a low effect of  
242 HIV presence or HIV exposure in their expression. However, levels of the T cell activation  
243 suppressor and a novel costimulatory molecule regulating T cell responses in the B7  
244 molecule family, B7H5, tended to be higher in the HIV group than in the HEU and UU  
245 groups and in the HEU group vs. the UU group. This molecule has also been reported to  
246 be involved in cancer<sup>38</sup> but, to our knowledge, it has never been reported in the HIV  
247 field.

248 Although our study analyzed 10 immune markers, more than in majority of related  
249 published studies, the main limitation is that it is a pilot study analysing a small  
250 paediatric cohort. However, despite the low number of participants in each group, we  
251 observed significant differences in the expression profiles of immune biomarkers across  
252 groups, strongly suggesting the effect of HIV infection and/or HIV exposure on these  
253 immune biomarkers expression. The consequences of this altered immune state found  
254 in HEU vs. UU could be more devastating than those in adults due to the presence of  
255 inflammation during the years of growth, organ maturation and neurocognitive

development<sup>8</sup>. Future research is warranted to assess whether these immune alterations persist beyond infancy, and if so, what would the long-term consequences of persistent inflammation might be.

Another limitation is the possible effect of antiretrovirals exposure in our study population, since it dramatically reduces systemic inflammation and immune activation, although not to levels comparable to HIV-uninfected population<sup>39</sup>, since residual immune activation, particularly monocyte/macrophage activation, was present<sup>29</sup>. Moreover, the effect of each specific antiretroviral on inflammation and immune activation in HIV is still under research<sup>39</sup>.

A third limitation was the lower age of HIV exposed children vs. the remaining two groups. However, the effect of children's age on immune marker expression remains unclear. Although some studies have observed a significant age-related increase in insoluble CD14 and other biomarkers in HEU<sup>16</sup>, others have only found significantly higher levels in HEU at birth, and the levels normalized after 6 months<sup>8</sup>. This phenomenon would reinforce the idea that the higher level of expression in some biomarkers vs. UU could be due to the HIV exposure and not to the age.

The strength of our pilot study is that we present, data on the gene expression level of 10 immune checkpoints molecules, some of them never before reported in HEU or in HIV infection (i.e. Siglec-10 or IRAK-M). Given routine CD4/CD8 measurements were absent or scarce during the clinical follow-up of the children from Kinshasa under study, we provide the first results related to their immune status. Our results demonstrate that HIV exposure, and not only HIV infection, alters the level of some immune biomarkers in the paediatric study population. Furthermore, our study reveals some biomarkers elevated in children due to HIV exposure that can contribute to poor health outcomes related to chronic inflammation in HEU<sup>6</sup>.

Our findings suggest that immune profile monitoring by immune biomarker quantification in blood should be integrated into PTMCT programs to monitor inflammation in HIV infected newborns as well as in those uninfected but exposed children born to HIV-infected mother.

We also evidenced, for the first time, that DBS use could be incorporated into screening studies requiring mRNA quantification of the host gene expression, decreasing the current requirements of blood sample volume and blood processing for plasma/serum

288 preparation. Thus, DBS use for immune checkpoints monitoring could be an advantage  
289 in settings with limited infrastructure for blood processing or when low blood volume in  
290 available, as in neonates. However, more studies are required comparing biomarker's  
291 expression levels in paired DBS/plasma samples and in larger population sets.

292

#### 293 **ACKNOWLEDGEMENTS**

294 We thank participants who participated in the study as well as local professionals  
295 responsible for the DBS and data collection of enrolled participants at Monkole Hospital  
296 in Kinshasa. We want to thank Silvia Carlos for her support during DBS transport to Spain.  
297 We also thank Paul Devlin for his proofreading of the manuscript.

298

#### 299 **STATEMENT OF ETHICS**

300 The study was conducted in accordance with the ethical guidelines of the 1975  
301 Declaration of Helsinki and was approved by La Paz Hospital Ethics Committee. An  
302 informed consent was obtained from parents, legally acceptable representative or  
303 guardians of participants' statements.

304

#### 305 **CONFLICTS OF INTEREST**

306 The authors have no conflicts of interest or funding to disclose.

307

#### 308 **FUNDING**

309 This study has been funded by Instituto de Salud Carlos III through the projects  
310 "PI14/01234, PIE15/00065, PI18/00148 and PI18/00904" (Co-funded by European  
311 Regional Development Fund, "A way to achieve Europe") and by Fundación Alonso. JAO  
312 and MRG was supported by grants from Comunidad de Madrid (PEJ15/BIO/AI-0021 and  
313 PEJD-2017/PRE-BMD-4497, respectively).

314

#### 315 **AUTHOR CONTRIBUTION**

316 A.H. and E.L.C. conceived and designed the study, contributed to data analysis and result  
317 discussion. A.H., G.R. and A.N. collaborated in sample shipping. A.N. selected clinical and

318 epidemiological data from patients. M.R.G. and J.A.O. performed experimental assays,  
319 and written the original manuscript. J.A.O., M.R.G. and C.R. performed the statistical  
320 analysis. A.H. and E.L.C. revised the paper and contributed to results discussion. All  
321 authors approved the final version.



## REFERENCES

1. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). AIDSinfo. <http://aidsinfo.unaids.org/>. Accessed March 25, 2020.
2. Drake AL, Thomson KA, Quinn C, et al. Retest and treat: a review of national HIV retesting guidelines to inform elimination of mother-to-child HIV transmission (EMTCT) efforts. *J Int AIDS Soc.* 2019;22(4):e25271. doi:10.1002/jia2.25271
3. Evans C, Humphrey JH, Ntozini R, Prendergast AJ. HIV-Exposed Uninfected Infants in Zimbabwe: Insights into Health Outcomes in the Pre-Antiretroviral Therapy Era. *Front Immunol.* 2016;7(JUN):190. doi:10.3389/fimmu.2016.00190
4. World Health Organization (WHO). Infant feeding for the prevention of mother-to-child transmission of HIV. [https://www.who.int/elena/titles/hiv\\_infant\\_feeding/en/](https://www.who.int/elena/titles/hiv_infant_feeding/en/). Accessed March 25, 2020.
5. Filteau S. The HIV-exposed, uninfected African child. *Trop Med Int Heal.* 2009;14(3):276-287. doi:10.1111/j.1365-3156.2009.02220.x
6. Prendergast AJ, Rukobo S, Chasekwa B, et al. Stunting is characterized by chronic inflammation in zimbabwean infants. *PLoS One.* 2014;9(2). doi:10.1371/journal.pone.0086928
7. Prendergast AJ, Chasekwa B, Rukobo S, et al. Intestinal Damage and Inflammatory Biomarkers in Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Exposed and HIV-Infected Zimbabwean Infants. *J Infect Dis.* 2017;216(6):651-661. doi:10.1093/infdis/jix367
8. Dirajlal-Fargo S, Mussi-Pinhata MM, Weinberg A, et al. HIV-exposed-uninfected infants have increased inflammation and monocyte activation. *AIDS.* 2019;33(5):845-853. doi:10.1097/QAD.0000000000002128
9. Jalbert E, Williamson KM, Kroehl ME, et al. HIV-Exposed Uninfected Infants Have Increased Regulatory T Cells That Correlate With Decreased T Cell Function. *Front Immunol.* 2019;10(MAR):595. doi:10.3389/fimmu.2019.00595
10. Sperk M, Domselaar R van, Neogi U. Immune Checkpoints as the Immune System Regulators and Potential Biomarkers in HIV-1 Infection. *Int J Mol Sci.* 2018;19(7). doi:10.3390/ijms19072000
11. Wada NI, Bream JH, Martínez-Maza O, et al. Inflammatory Biomarkers and Mortality Risk among HIV-Suppressed Men: A Multisite Prospective Cohort Study.

- Clin Infect Dis*. 2016;63(7):984-990. doi:10.1093/cid/ciw409
12. Patil NK, Guo Y, Luan L, Sherwood ER. Targeting immune cell checkpoints during sepsis. *Int J Mol Sci*. 2017;18(11). doi:10.3390/ijms18112413
  13. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Immune checkpoint blockade: A common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell*. 2015;27(4):450-461. doi:10.1016/j.ccell.2015.03.001
  14. Klatt NR, Chomont N, Douek DC, Deeks SG. Immune Activation And Hiv Persistence: Implications For Curative Approaches To Hiv Infection. *Immunol Rev*. 2013;254(1):326-342. doi:10.1111/imr.12065
  15. De Mulder M, Holguín Á. Utilidad de los dried blood spots para monitorizar la infección por virus de la inmunodeficiencia humana en los programas de salud pública de países en desarrollo. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013;31(2):100-107. doi:10.1016/j.eimc.2012.03.008
  16. Baroncelli S, Galluzzo CM, Liotta G, et al. Immune Activation and Microbial Translocation Markers in HIV-Exposed Uninfected Malawian Infants in the First Year of Life. *J Trop Pediatr*. 2019;65(6):617-625. doi:10.1093/tropej/fmz022
  17. Fernández McPhee C, Álvarez P, Prieto L, et al. HIV-1 infection using dried blood spots can be confirmed by Bio-Rad Geenius™ HIV 1/2 confirmatory assay. *J Clin Virol*. 2015;63:66-69. doi:10.1016/j.jcv.2014.12.018
  18. Cepheid. HIV-1 Molecular Test - Xpert HIV-1 Qual. <https://www.cepheid.com/en/tests/Virology/Xpert-HIV-1-Qual>. Accessed March 26, 2020.
  19. WHO. Roche. COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test v2.0.; 2012.
  20. Robins EB, Blum S. Hematologic reference values for African American children and adolescents. *Am J Hematol*. 2007;82(7):611-614. doi:10.1002/ajh.20848
  21. Avendaño-Ortiz J, Maroun-Eid C, Martín-Quirós A, et al. PD-L1 Overexpression During Endotoxin Tolerance Impairs the Adaptive Immune Response in Septic Patients via HIF1 $\alpha$ . *J Infect Dis*. 2018;217(3):393-404. doi:10.1093/infdis/jix279
  22. Flajnik MF, Tlapakova T, Criscitiello MF, Krylov V, Ohta Y. Evolution of the B7 family: Co-evolution of B7H6 and NKp30, identification of a new B7 family member, B7H7, and of B7's historical relationship with the MHC. *Immunogenetics*. 2012;64(8):571-590. doi:10.1007/s00251-012-0616-2

23. Wykes MN, Lewin SR. Immune checkpoint blockade in infectious diseases. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(2):91-104. doi:10.1038/nri.2017.112
24. Von Gunten S, Bochner BS. Basic and clinical immunology of Siglecs. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1143:61-82. doi:10.1196/annals.1443.011
25. Knudsen TB, Ertner G, Petersen J, et al. Plasma CD163 independently predicts all-cause mortality from HIV-1 infection. *J Infect Dis*. 2016. doi:10.1093/infdis/jiw263
26. Sandler NG, Wand H, Roque A, et al. Plasma Levels of Soluble CD14 Independently Predict Mortality in HIV Infection. *J Infect Dis*. 2011;203(6):780-790. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3071127/>. Accessed March 25, 2020.
27. Krishnan S, Eleanor M. P. Wilson, Virginia Sheikh, et al. Evidence for Innate Immune System Activation in HIV Type 1–Infected Elite Controllers. *J Infect Dis*. 2014;209:931-939. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3935475/>. Accessed March 25, 2020.
28. Krebs SJ, Ananworanich J. Immune activation during acute HIV infection and the impact of early antiretroviral therapy. *Curr Opin HIV AIDS*. 2016;11(2):163-172. doi:10.1097/COH.0000000000000228
29. Wada NI, Jacobson LP, Margolick JB, et al. The effect of HAART-induced HIV suppression on circulating markers of inflammation and immune activation. *AIDS*. 2015;29(4):463-471. doi:10.1097/QAD.0000000000000545
30. Letizia A, Eller MA, Polyak C, et al. Biomarkers of Inflammation Correlate With Clinical Scoring Indices in Human Immunodeficiency Virus-Infected Kenyans. *J Infect Dis*. 2019;219(2):284-294. doi:10.1093/infdis/jiy509
31. Kirkegaard-Klitbo DM, Mejer N, Knudsen TB, et al. Soluble CD163 predicts incident chronic lung, kidney and liver disease in HIV infection. *AIDS*. 2017;31(7):981-988. doi:10.1097/QAD.0000000000001432
32. Weersma RK, Oostenbrug LE, Nolte IM, et al. Association of interleukin-1 receptor-associated kinase M (IRAK-M) and inflammatory bowel diseases. *Scand J Gastroenterol*. 2007;42(7):827-833. doi:10.1080/00365520601114024
33. Hu K, He S, Xiao J, et al. Interaction between herpesvirus entry mediator and HSV-2 glycoproteins mediates HIV-1 entry of HSV-2-infected epithelial cells. *J Gen Virol*. 2017;98(9):2351-2361. doi:10.1099/jgv.0.000895



34. Deshmane SL, Amini S, Sen S, Khalili K, Sawaya BE. Regulation of the HIV-1 promoter by HIF-1 and Vpr proteins. *Viro J.* 2011;8:477. doi:10.1186/1743-422X-8-477
35. Li Y, Zhao L, Qi Y, Yang X. MicroRNA-214 upregulates HIF-1 $\alpha$  and VEGF by targeting ING4 in lung cancer cells. *Mol Med Rep.* 2019;19(6):4935-4945. doi:10.3892/mmr.2019.10170
36. Chaudhry A, Das SR, Jameel S, et al. HIV-1 Nef induces a Rab11-dependent routing of endocytosed immune costimulatory proteins CD80 and CD86 to the Golgi. *Traffic.* 2008;9(11):1925-1935. doi:10.1111/j.1600-0854.2008.00802.x
37. Munday J, Kerr S, Ni J, et al. Identification, characterization and leucocyte expression of Siglec-10, a novel human sialic acid-binding receptor. *Biochem J.* 2001;355(Pt 2):489-497. doi:10.1042/0264-6021:3550489
38. Dong Z, Zhang L, Xu W, Zhang G. EGFR may participate in immune evasion through regulation of B7-1 expression in non-small cell lung carcinoma. *Mol Med Rep.* 2018;18(4):3769-3779. doi:10.3892/mmr.2018.9361
39. Hileman CO, Funderburg NT. Inflammation, Immune Activation, and Antiretroviral Therapy in HIV. *Curr HIV/AIDS Rep.* 2017;14(3):93-100. doi:10.1007/s11904-017-0356-x

#### FIGURE LEGENDS

**Legend Figure 1.** Results are plotted according to the first two principal components accounting for 79.8% of the total variation (Component 1=48.5% and Component 2=31.3%). Each dot represents data from a single child sample: HIV-exposed but uninfected (HEU) in orange; HIV-infected (HIV+) in blue; HIV-unexposed and uninfected (UU) in green. The clustering of samples is represented by their respective 95% confidence interval ellipse from centroid. Vector of each immune marker are represented by red lines.

**Legend Figure 2.** Relative expression by RT-qPCR of CD14, HVEM, B7.1, HIF-1 $\alpha$ , Siglec 10, IRAK-M, CD163, B7H5, PD-L1 and Galectin-9 genes on mRNA extracted from DBS from a paediatric cohort of DRC. HIV+, HIV-infected children; HEU, HIV-exposed but born uninfected children; UU, HIV-unexposed and uninfected children; P values and Kruskal

Wallis statistics (K-S) for statistically significant biomarkers are shown. \*,  $P < .05$ ; \*\*,  $P < .01$ ; \*\*\*,  $P < .001$  on Mann–Whitney U test between groups. Figure presented in IAS Congress 2019, abstract TUPEC444.

**Table 1. Main features of the study cohort.**

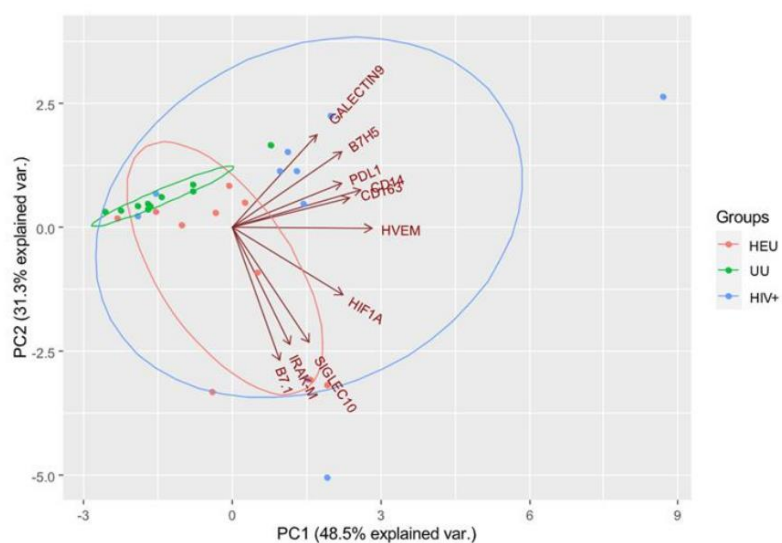
	HIV+	HEU	UU
Number of children	10	10	10
Male	6	5	5
Median age at sampling in years [IQR]	12 [10.7-15.3]	3 [0-8.5]	10.5 [8.3-12]
Breastfed	5	7	unknown
Positive serological HIV status by Geenius	10	4	0
Positive HIV+ molecular diagnosis by Xpert HIV-1 Qual	10	0	0
Antiretroviral exposure after birth	10	7 (5 prophylaxis)	0
Mean VL (log/ml) (range) by Cobas Roche	4.3 (2.7-5.3)	-	-

**Legend Table 1.** HIV+, HIV-1 infected children; HEU, HIV-exposed but born uninfected children; UU, HIV-unexposed and uninfected children; VL, HIV-1 RNA copies per plasma millilitre (ml); log, *logarithm*. *Geenius*, Bio-Rad *Geenius™ HIV 1/2 Confirmatory Assay*[26]; *Xpert HIV-1 Qual*, *Cepheid Xpert HIV-1 Qual*[18].

**Table 2. Principal component analysis of ten immune markers from 30 pediatric samples from the study pediatric cohort.**

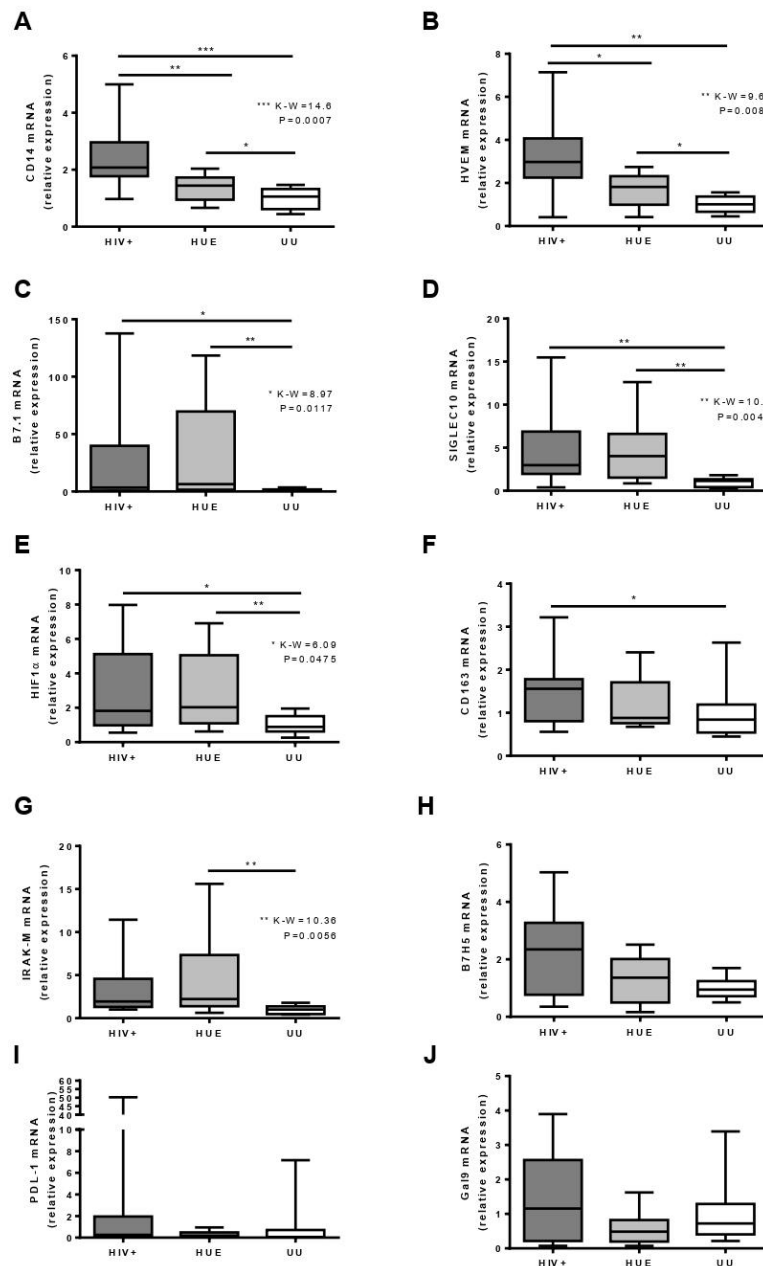
Principal Component	1	2	3	4
<b>Vector values for the component</b>				
B7.1	0.145	<b>0.511</b>	0.234	0.141
B7-H5	0.338	-0.290	-0.215	-0.484
CD14	<b>0.398</b>	-0.146	0.048	0.004
CD163	0.361	-0.114	<b>0.463</b>	0.249
HIF-1 $\alpha$	0.342	0.258	-0.378	0.009
HVEM	0.433	0.003	0.030	-0.102
IRAK-M	0.179	0.449	-0.238	-0.467
Galectin-9	0.262	-0.357	0.386	-0.231
PD-L1	0.338	-0.172	-0.486	<b>0.624</b>
Siglec-10	0.239	0.441	0.310	0.111
<b>Percent of total variance explained by the component</b>	48.5	31.3	6.3	4.1

Figure 1. PCA graphical results of immune biomarker profiles in RDC children.



**Legend Figure 1.** Results are plotted according to the first two principal components accounting for 79.8% of the total variation (Component 1=48.5% and Component 2=31.3%). Each dot represents data from a single child sample: HIV-exposed but uninfected (HEU) in orange; HIV-infected (HIV+) in blue; HIV-unexposed and uninfected (UU) in green. The clustering of samples is represented by their respective 95% confidence interval ellipse from centroid. Vector of each immune marker are represented by red lines.

Figure 2. Immune markers expression in HIV+, HEU and UU from the study population.



**Legend Figure 2.** Relative expression by RT-qPCR of CD14, HVEM, B7.1, HIF-1α, Siglec 10, IRAK-M, CD163, B7H5, PD-L1 and Galectin-9 genes on mRNA extracted from DBS from a paediatric cohort of DRC. HIV+, HIV-infected children; HEU, HIV-exposed but born uninfected children; UU, HIV-unexposed and uninfected children; P values and Kruskal Wallis statistics (K-S) for statistically significant biomarkers are shown. \*, P<.05; \*\*, P<.01; \*\*\*, P<.001 on Mann-Whitney U test between groups. Figure presented in IAS Congress 2019, abstract TUPEC444.

## Brief Report - PEDIATRICS/2020/007856

**Dried blood use for vaccine-preventable diseases IgG detection in limited resource settings**

Ana Rodríguez-Galet<sup>a</sup>, Ana Valadés-Alcaraz<sup>a</sup>, Marina Rubio-Garrido<sup>a</sup>, Mario Rodríguez-Domínguez<sup>b</sup>, Juan Carlos Galán<sup>b</sup>, Gabriel Reina<sup>c</sup>, Adolphe Ndarabu<sup>d</sup>, and Africa Holguín<sup>a</sup>.

**Affiliations:**

<sup>a</sup>HIV-1 Molecular Epidemiology Laboratory, Microbiology and Parasitology Department, Ramón y Cajal University Hospital-IRYCIS and CIBERESP-RITIP-CORISPe, Madrid, Spain

<sup>b</sup>Virology Section, Microbiology and Parasitology Department, Hospital Ramón y Cajal-IRYCIS and CIBER-ESP, Madrid, Spain.

<sup>c</sup>Microbiology Department, Clínica Universidad de Navarra. Navarra Institute for Health Research (IdiSNA). Pamplona, Spain.

<sup>d</sup>Monkole Hospital, Kinshasa, Democratic Republic of Congo

**Address correspondence to:** África Holguín, HIV-1 Molecular Epidemiology Laboratory Ramón y Cajal University Hospital-IRYCIS and CIBERESP-RITIP. Ctra. Colmenar Viejo, Km 9,100, 28034 Madrid, Spain, [africa.holguin@salud.madrid.org], Phone: +34-913368153.

**Short title:** Dried blood for vaccine-preventable disease IgG detection

**Funding Source:** No external funding for this manuscript.

**Financial Disclosure:** No financial relationships relevant to this article to disclose

**Conflict of Interest:** No potential conflicts of interest to disclose

**Abbreviations:** DBS, dried blood specimens; DRC; The Democratic Republic of Congo; DTP, diphtheria, pertussis and tetanus; MMR (mumps-measles-rubella); HIV, human immunodeficiency virus; WHO; World Health Organization;

**What's Known on This Subject:** Full vaccination can reduce infant and children morbidity and mortality. Plasma and serum samples are the gold standard specimens to analyze and quantify the presence of protective IgG antibodies against pathogens responsible of vaccine-preventable diseases.

**What This Study Adds:** The study presents the first data regarding the validity of DBS to test immune protection to six pathogens (diphtheria/tetanus/pertussis/measles/mumps/rubella) with available vaccines in HIV-infected-pediatric population, establishing the cut-off-values that provide optimal sensitivity and/or specificity in dried blood for each infection.

## **BACKGROUND**

The Democratic Republic of Congo (DRC) presents high mortality rate in children under 5 years-old, reaching 88 per 1000 live births(1). The increase in global vaccine coverage has reduced disease, morbidity, and death in children (2-3). However, vaccine- preventable diseases such as measles or tetanus remain the leading cause of pediatric deaths in the DRC (4), where periodic measles outbreaks spread rapidly among unvaccinated or incompletely vaccinated populations. According to 2019- WHO-data, diphtheria, tetanus and pertussis (DTP) third dose coverage, broadly used as an indicator of a country's ability to provide immunization services, was 81% in the DRC (5) and less than 60% for the first and single dose of measles vaccine administered at 9 months- old(6). Children living with human immunodeficiency virus (HIV) tend to have lesser vaccine protection against vaccine-preventable diseases when compared to unexposed children(7). Most of HIV-infected children live in low-middle income countries where scarce laboratory resources and limited conditions for collecting and handling serum/plasma from blood difficult monitoring of real pediatric vaccination coverage. In these circumstances, dried blood specimens (DBS) represent a convenient sample for antibody detection(8), being easy to collect, store and transport without the need for cold chain(9). Our study analyses, for the first time, the validity of DBS to test the immune protection to 6 pathogens causing immuno-preventable diseases in HIV-infected children/adolescents, establishing the cut-off values that provide optimal sensitivity and/or specificity in DBS for each infection.

## **METHODS**

The study was conducted in accordance with the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki and was approved by the Ethical Committee in Monkole hospital (Kinshasa; DRC). An informed consent was obtained from parents, legally acceptable representative or guardians of participant statements. Paired DBS/plasma specimens were collected from 42 HIV-infected-children and

adolescents (13.7 year-old mean age), during 2017-2018 in Kalembelembe and Monkole hospitals (Kinshasa). Samples were shipped to our center in Spain to analyze and quantify the presence of protective IgG against six pathogens responsible for vaccine-preventable diseases: diphtheria, tetanus, pertussis, measles, mumps and rubella. Five  $\mu$ l of plasma and 1 DBS dot (70 $\mu$ l of blood) eluted in 770 $\mu$ l of phosphate-buffered-saline were tested by each specific VirClia<sup>®</sup> IgG kit (Vircell). Taking as reference results based on WHO positivity cut-off values providing 96-100% sensitivity and 100% specificity, we calculated DBS sensitivity/specificity/positive-negative predictive value for each test. ROC curves were generated with R software to get an optimal cut-off that offered maximum sensitivity and/or specificity for protective IgG detection against each pathogen in DBS from 42 HIV-infected pediatric patients.

## RESULTS

Using plasma samples, our cohort showed immune protection to diphtheria (72%), tetanus (7%), pertussis (2.3%), measles (64%), mumps (69%) and rubella (93%). When plasma cut-off was used for DBS results interpretation, the sensitivity of each VirClia<sup>®</sup> IgG test for protective antibodies detection was 97-100% for pertussis/diphtheria/mumps/rubella and slightly lower for measles (81.8%) and tetanus (66.7%). Specificity remained close to 100% for pertussis (97.6%), but decreased for tetanus (87.2%), measles (40%), mumps (7.7%) and diphtheria/rubella (0%). We calculated a new cut-off value for each test offering optimal sensitivity and/or specificity in DBS, always increasing to reaching maximum specificity. The PPV ranged from 28.6% (tetanus) to 92.7% (rubella), while figures improved when applying the optimal DBS cut-off. Considering NPV, values ranged from 0% (rubella/diphtheria) to 100% (mumps/pertussis) using manufacturer cut-off, increasing from 38.5% to 100% when the new DBS cut-off was applied (**Table 1**).



## DISCUSSION

We present the first data demonstrating that dried blood can be used to study the seroprevalence against diphtheria, tetanus, measles, rubella and mumps with acceptable sensitivity and/or specificity (depending on clinical needs) only optimizing the plasma cut-off value for each pathogen, as have been reported for other pathogens (10). Pertussis was the only pathogen that achieved 100% sensitivity and 97.6% specificity in DBS with the same cut-off than plasma. The use of retrospective samples collected for other studies with unavailable data related to immunization status and number of doses received for each vaccine is a limitation of this study. Our results could help to expand antibody detection for vaccination coverage monitoring among HIV-infected children in resources-limited settings or when plasma/serum collection is difficult. We reinforce the need for optimizing the plasma cut-off value in paired plasma/DBS before using DBS to study the seroprevalence against pathogens.

## REFERENCES

1. United Nations Inter-Agency. Group for Child Mortality Estimation (UN IGME). Levels & Trends in Child Mortality: Report 2019. United Nations Children's Fund, New York, 2019.
2. World Health Organization. Global Health Observatory Data. Available at <https://www.who.int/gho/immunization/en/>. Last update July 2019. Accessed April 16, 2020.
3. World Health Organization, UNICEF. Progress and Challenges with Achieving Universal Immunization Coverage, 2018. (Data as of July 2019).
4. Institute of Health Metrics and Evaluation (IHME). The Democratic Republic of the Congo. Available at <http://www.healthdata.org/democratic-republic-congo>. Last update 2017. Accessed April 17, 2020.
5. World Health Organization. WHO vaccine-preventable diseases: Monitoring system. Democratic Republic of the Congo. Available at [https://apps.who.int/immunization\\_monitoring/globalsummary/estimates?c=COD](https://apps.who.int/immunization_monitoring/globalsummary/estimates?c=COD) Last update July 2019. Accessed April 20, 2020.
6. World Health Organization /African Region. Deaths from Democratic Republic of the Congo measles outbreak top 6000. Available at

<https://www.afro.who.int/news/deaths-democratic-republic-congo-measles-outbreak-top-6000>. Accessed April 16, 2020

7. Adetokunboh OO, Ndwandwe D, Awotiwon A, Uthman OA, Wiysonge CS. Vaccination among HIV-infected, HIV-exposed uninfected and HIV- uninfected children: a systematic review and meta-analysis of evidence related to vaccine efficacy and effectiveness. *Hum Vaccin Immunother*. 2019;**15**(11):2578- 2589.
8. Fernández McPhee C, et al. HIV-1 infection using dried blood spots can be confirmed by Bio-Rad Geenius™ HIV 1/2 confirmatory assay. *J Clin Virol*. 2015;**63**:66-69.
9. Su X, Carlson BF, Wang X, et al. Dried blood spots: An evaluation of utility in the field. *J Infect Public Health*. 2018;**11**(3):373–376.
10. Holguín A, Norman F, Martín L, et al. Dried blood as an alternative to plasma or serum for *Trypanosoma cruzi* IgG detection in screening programs. *Clin Vaccine Immunol*. 2013;**20**(8):1197–1

**Table 1.** Performance of VirClia® IgG tests for protective IgG detection against six pathogens responsible for vaccine-preventable diseases using dried blood from 42 pediatric patients.

		MEASLES					MUMPS					RUBELLA				
		<i>Cut-off</i>	Sen	Spe	PPV	NPV	<i>Cut-off</i>	Sen	Spe	PPV	NPV	<i>Cut-off</i>	Sen	Spe	PPV	NPV
PLASMA		>1,1	100%	100%	100%	100%	>1,1	100%	100%	100%	100%	>1.1	99%	100%	100%	100%
DBS with PLASMA <i>cut-off</i>		>1,1	81.8%	40%	71%	54.6%	>1,1	100%	7.7%	70.7%	100%	>1.1	97.4%	0%	92.7%	0%
DBS	Max Sen	≥0,73	100%	13.3%	67.5%	100%	>1,1	100%	7.7%	70.7%	100%	>1.04	100%	0%	95%	0%
	Max Spe	≥2,83	55.6%	100%	100%	55.6%	≥6.18	37.9%	100%	100%	41,9%	≥3.97	43.6%	100%	100%	12%
	Optimal Sen and Spe	≥2,7	59.3%	93%	94%	56%	≥5.19	55.2%	76.9%	84%	43%	≥1.84	92.3%	66.7%	97.3%	40%
		DIPHTHERIA					TETANUS					PERTUSSIS				
		<i>Cut-off (UI/ml)</i>	Sen	Spe	PPV	NPV	<i>Cut-off (UI/ml)</i>	Sen	Spe	PPV	NPV	<i>Cut-off (UI/ml)</i>	Sen	Spe	PPV	NPV
PLASMA		>0.01	100%	100%	100%	100%	>0,2	96%	100%	100%	100%	>120	100%	100%	100%	100%
DBS with PLASMA <i>cut-off</i>		>0.01	100%	0%	71.4%	0%	>0,2	66.7%	87.2%	28.6%	97.1%	>120	100%	97.6%	50%	100%
DBS	Max Sen	≥0.03	100%	25%	76.9%	100%	≥0,11	100%	46.2%	12.5%	100%	≥586	100%	100%	100%	100%
	Max Spe	≥0.1	36.7%	100%	100%	38.7%	≥0,5	33.3%	100%	10%	95.1%	≥586	100%	100%	100%	100%
	Optimal Sen and Spe	≥0.09	46.7%	83.3%	78.5%	38.5%	≥0,24	66.7%	89.7%	33.3%	97.2%	≥586	100%	100%	100%	100%

DBS; dried blood specimens; Max, maximum; Sen, sensitivity; Spe, specificity; PPV, positive predictive value; NPV; negative predictive value; ml, millilitre; UI, international Units. The plasma cut-off points provided by VirCell have been taken as a reference.

# Anexo VI

# Recursos en internet

–HIVdb (Universidad de Stanford, EE. UU.)

<https://hivdb.stanford.edu/hivdb/by-sequences/>

–Listado de CRF del Laboratorio Nacional de Los Alamos

<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>

–Alineamientos de secuencias VIH del Laboratorio Nacional de Los Alamos

<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/NEWALIGN/align.html>

–Base de datos VIH del Laboratorio Nacional de Los Alamos

<https://www.hiv.lanl.gov/components/sequence/HIV/search/search.html>

–ClustalX

<http://www.clustal.org/>

–MEGA6

<https://www.megasoftware.net/>

– MedCalc Software bvba versión 13.2.2

[https://www.medcalc.org/calc/diagnostic\\_test.php](https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php)

– GenBank

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

– PubMed

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>

– Global Burden of Disease (GBD). Health Metrics and Evaluation (IHME). University of Washington.

<http://ghdx.healthdata.org/>

– Infogram

<https://infogram.com/app/#/library>